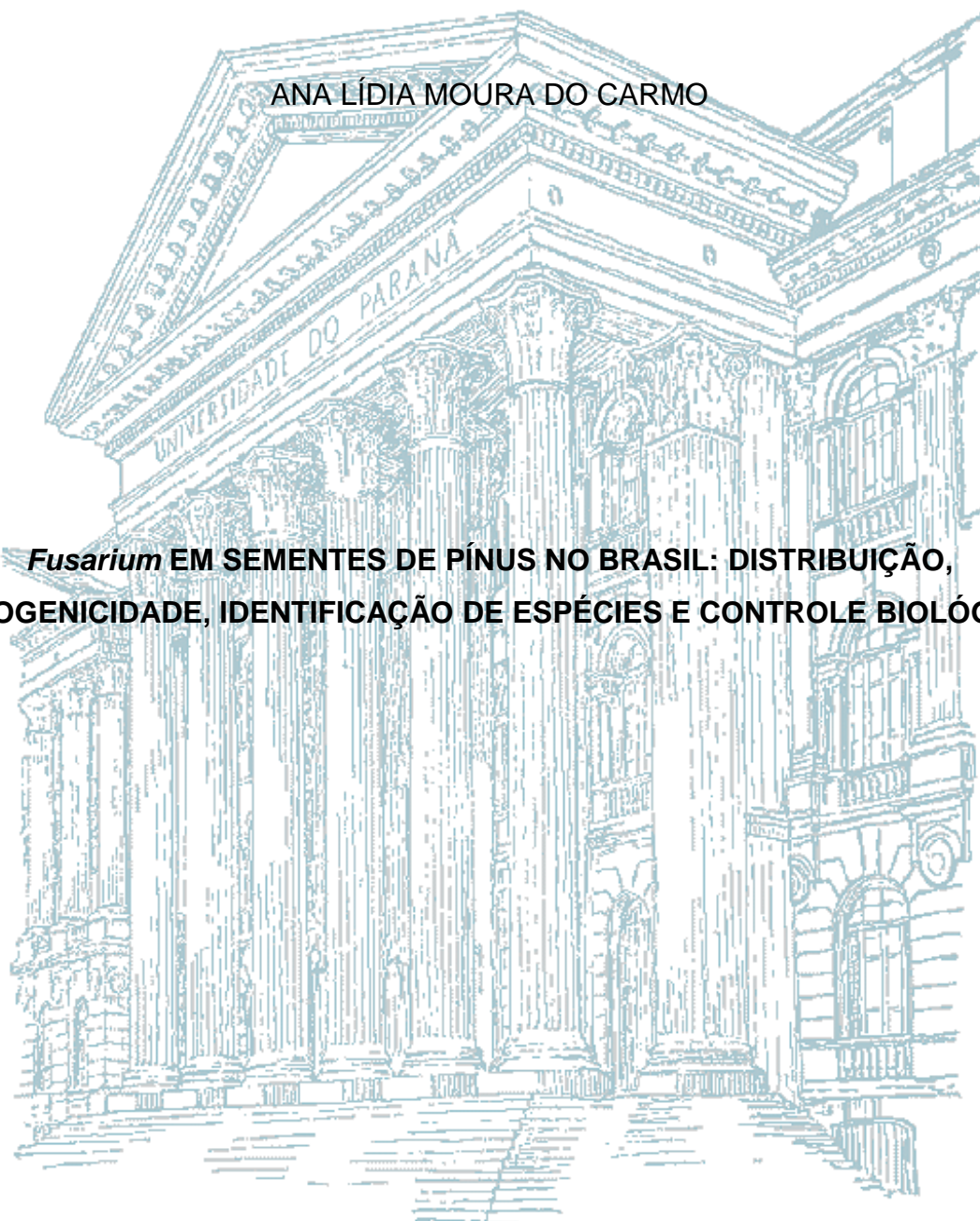


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANA LÍDIA MOURA DO CARMO

***Fusarium* EM SEMENTES DE PÍNUS NO BRASIL: DISTRIBUIÇÃO,
PATOGENICIDADE, IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES E CONTROLE BIOLÓGICO**



CURITIBA

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANA LÍDIA MOURA DO CARMO

***Fusarium* EM SEMENTES DE PÍNUS NO BRASIL: DISTRIBUIÇÃO,
PATOGENICIDADE, IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES E CONTROLE BIOLÓGICO**

CURITIBA

2017

ANA LÍDIA MOURA DO CARMO

***Fusarium* EM SEMENTES DE PÍNUS NO BRASIL: DISTRIBUIÇÃO,
PATOGENICIDADE, IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES E CONTROLE BIOLÓGICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Álvaro Figueredo dos Santos
Coorientador: Prof. Dr. Dauri José Tessmann
Prof. Dr. Flávio Augusto de O. Garcia
Dra. Elisa Serra Negra Vieira.
Dra. Bárbara Eckstein

CURITIBA

2017

C287 Carmo, Ana Lúcia Moura do
Fusarium em sementes de pinus no Brasil: distribuição,
patogenicidade, identificação de espécies e controle biológico / Ana
Lúcia Moura do Carmo. Curitiba: 2017.
87 f. il.

Orientador: Álvaro Figueredo dos Santos
Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná.
Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação
em Agronomia – Produção Vegetal.

1. Pinheiro – Doenças e fungos. 2. Sementes - Patologia.
3. Fitopatologia. I. Santos, Álvaro Figueredo dos. II. Universidade
Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias. Programa de
Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal. III. Título.

CDU 674.032.475.4(81):631.53.01



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor CIÊNCIAS AGRÁRIAS
Programa de Pós-Graduação AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL)

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **ANA LIDIA MOURA DO CARMO** intitulada: *Fusarium* EM SEMENTES DE PINUS NO BRASIL: DISTRIBUIÇÃO, PATOGENICIDADE, IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES E CONTROLE BIOLÓGICO, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO.

Curitiba, 23 de Fevereiro de 2017.


ALVARO FIGUEIREDO DOS SANTOS


Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


ELISA SERRA NEGRA VIEIRA

Avaliador Externo (EMBRAPA)


CELSO GARCIA AUER

Avaliador Externo (EMBRAPA)


FLAVIO AUGUSTO DE OLIVEIRA GARCIA

Avaliador Externo (UNICENTRO)


LUCIMERIS RUARO

Avaliador Externo (UFPR)

C287 Carmo, Ana Lúcia Moura do
Fusarium em sementes de pinus no Brasil: distribuição,
patogenicidade, identificação de espécies e controle biológico / Ana
Lúcia Moura do Carmo. Curitiba: 2017.
87 f. il.

Orientador: Álvaro Figueredo dos Santos
Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná.
Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação
em Agronomia – Produção Vegetal.

1. Pinheiro – Doenças e fungos. 2. Sementes - Patologia.
3. Fitopatologia. I. Santos, Álvaro Figueredo dos. II. Universidade
Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias. Programa de
Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal. III. Título.

CDU 674.032.475.4(81):631.53.01

Esta tese é dedicada ao único que é
digno de toda honra e toda glória, Jesus.

AGRADECIMENTOS

À Deus que me sustenta a cada dia e me guia nos caminhos que devo andar e é fiel em todas as coisas.

Aos meus pais Adelmo e Heliane, instrumentos do Senhor para me proporcionar a oportunidade de estudar. Meus mestres na vida, meu suporte em todos os momentos!

Aos meus irmãos Mariana, Raquel, João Lucas e Isabel, pela força, incentivo, repreensões e pelos momentos de alegria!

Ao Jairo, meu amado, que sempre esteve do meu lado, pelo companheirismo nas horas boas e difíceis!

Ao meu orientador Dr. Álvaro Figueredo dos Santos, um verdadeiro mestre que me acolheu em sua linha de pesquisa mostrando-me os caminhos da ciência na busca do conhecimento e um exemplo de humildade.

À Dra. Elisa Serra Negra Vieira, pelos conhecimentos adquiridos, pela oportunidade de novos aprendizados, pela paciência e prontidão em me ensinar.

À Dra Bárbara Eckstein, que se disponibilizou em momentos críticos do trabalho, por suas contribuições e por estar sempre disponível em me atender, mesmo distante.

Aos coorientadores Dr. Flávio Augusto de Oliveira Garcia, meu primeiro professor e mestre que me abriu as portas para a pesquisa e Dr. Dauri José Tessmann, cujos ensinamentos foram muito importantes para a finalização dessa tese.

Ao professor Dr. Henrique Duarte pela receptividade e acolhimento para a disciplina de prática em docência e pelas sugestões e conselhos para melhoria desse trabalho.

Ao Dr. Celso Garcia Auer, pelos ensinamentos.

À CAPES pela concessão da bolsa e ao programa de pós graduação em agronomia da UFPR, pela oportunidade de realização desse doutorado.

À Caroline Buhner e ao Davi pelo acolhimento no laboratório, pela ajuda e conselhos, pelo carinho e amizade que foi construída nesses quatro anos.

Aos meus amigos Flávia, Heloíse, Edson, Heloísa, Géssica e João que foram bênçãos em minha vida e que proporcionaram muitos momentos de risadas.

Aos colegas do laboratório Cris, Maislan, Etienne, Pedro, Nicolas, Fernando, Vivien e Helieth.

Aos professores e funcionários da pós-graduação, em especial pela Lucimara Antunes que sempre buscou me ajudar quando precisei.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho, acreditaram e torceram por mim.

RESUMO

As doenças causadas por *Fusarium* spp. em pinus reduzem principalmente a produção de mudas por sementes, pelo fato das mesmas serem veículo de disseminação desse patógeno. Visando a obtenção de novas abordagens sobre a associação patogênica de *Fusarium* spp. com sementes de pinus no Brasil, este estudo trata da detecção, patogenicidade, identificação e controle biológico de isolados de *Fusarium* pertencentes aos complexos *F. incarnatum*, *F. fujikuroi*, *F. graminearum* e *F. oxysporum*. O capítulo 1 “*Fusarium* spp. em sementes de pinus tropicais e subtropicais no Brasil” teve como objetivo detectar e avaliar a patogenicidade de isolados de *Fusarium* sp. em lotes de sementes comerciais de seis espécies de pinus tropicais e duas de pinus subtropicais, advindas das principais regiões produtoras brasileiras. Foi observada a associação de oito espécies de *Fusarium* nas sementes de *Pinus* spp., sendo as espécies *F. incarnatum-equiseti*, *F. oxysporum*, *F. graminearum*, *F. proliferatum*, *F. verticillioides*, complexo *F. fujikuroi*, *F. meridionale* e *F. andiyazi* encontradas em pinus subtropicais e *F. oxysporum*, complexo *F. fujikuroi* e *Fusarium* sp. em pinus tropicais. As espécies *F. graminearum*, *F. oxysporum*, complexo *F. fujikuroi*, *F. meridionale* e *F. andiyazi* foram patogênicas para pinus subtropicais e *F. fujikuroi*, *F. oxysporum* e *Fusarium* sp. para pinus tropicais. O capítulo 2 “Caracterização molecular e morfológica de isolados de *Fusarium* spp. provenientes de sementes de pinus no Brasil” teve como objetivo identificar e avaliar a variabilidade de isolados de *Fusarium* spp. de sementes de pinus de regiões produtoras, por meio de características morfológicas e moleculares. Para caracterização morfológica, os isolados de *Fusarium* foram crescidos em placas com meio de folha cravo agar (FCA) e após 14 dias de incubação a 24°C com fotoperíodo de 12 horas. As culturas foram avaliadas quanto tipo de célula conidiogênica, tipo de célula reprodutiva, dimensões das estruturas reprodutivas, disposição dos microconídios sobre a célula conidiogênica, ausência ou presença de esporodóquio e clamidósporos. Para a análise molecular, amplificaram-se as regiões fator de alongação 1-alfa e a segunda maior subunidade da RNA polimerase (RPB2). Do total de 29 isolados estudados, 13 corresponderam ao complexo *Fusarium fujikuroi*, sete ao complexo *Fusarium oxysporum*, três ao complexo *Fusarium incarnatum* e três ao complexo *Fusarium graminearum*, os demais foram identificados como *Fusarium* sp. O capítulo 3 “Controle biológico de *Fusarium* spp. por *Trichoderma atroviride* em sementes de pinus.” teve como objetivo testar fungos do gênero *Trichoderma* de sementes florestais quanto ao seu potencial de controle de *Fusarium* em sementes de pinus e avaliar a capacidade dos mesmos em promover o crescimento inicial de plântulas. Os principais resultados foram: *Trichoderma atroviride* inibiu o crescimento micelial de *Fusarium* spp. *in vitro* e promoveu o crescimento inicial de plântulas de pinus. O capítulo 4 “Controle biológico de *Fusarium* e promoção do crescimento de pinus por bactérias endofíticas” teve como objetivo testar bactérias endofíticas de sementes florestais quanto ao seu potencial de controle de *Fusarium* spp. em sementes de pinus e avaliar a sua capacidade em promover o crescimento inicial de plântulas. Os principais resultados foram: *Bacillus* sp., *Bacillus velezensis*, *Bacillus methylotrophicus* e *Paenibacillus polymyxa* inibiram o crescimento micelial de *Fusarium meridionale*, isolado do complexo *Fusarium fujikuroi*, *Fusarium oxysporum* e *Fusarium* sp. Não houve efeito de bactérias endofíticas no controle *in vivo* e na

promoção do crescimento inicial de plântulas de *P. taeda* e *P. elliottii* var. *elliottii* var. *elliottii*.

Palavras-chave: Patologia de sementes; *Fusarium* spp.; espécies florestais; *Trichoderma* spp; bactéria endofítica.

ABSTRACT

The diseases caused in pinus by *Fusarium* sp. mainly reduce the production of seedlings, because they are vehicles of dissemination of these pathogens. Aiming to obtain new approaches on the pathogenic association of *Fusarium* spp. with pinus seeds in Brazil, this study deals with the detection, pathogenicity, identification and biological control of *Fusarium* sp. Chapter 1 "*Fusarium* spp. In tropical and subtropical pinus seeds in Brazil" aims to detect and evaluate the pathogenicity of *Fusarium* spp. in commercial seed lots of six species of tropical pine and two of subtropical pine, obtained from the main Brazilian producing regions. The main results were: In this work, we demonstrate the association of eight species of *Fusarium* with seeds of *Pinus* spp. in Brazil, which *F. incarnatum-equiseti*, *F. oxysporum*, *F. graminearum*, *F. proliferatum*, *F. verticillioides*, complexo *F. fujikuroi*, *F. meridionale* e *F. andiyazi* were detected in subtropical pinus and *F. oxysporum*, *F. fujikuroi* complex and *Fusarium* sp. were detected in tropical pinus seeds. Chapter 2 "Molecular and morphological characterization of *Fusarium* spp. from pinus seeds in Brazil" aims to identify and evaluate the variability of isolates of *Fusarium* spp. of pinus seeds from producing regions, through molecular and morphological characteristics. For molecular analyses, the regions elongation factor 1- α and the second largest subunit of RNA polymerase II gene were amplified. For the morphological characteristic, the *Fusarium* isolates were grown in Petri dishes with leaf carnation agar medium and after 14 days of incubation in 24 °C, the cultures were evaluated for type of Conidiogenic cell, reproductive cell type, dimensions of reproductive structures, microconidia disposition on the conidiogenic cell, absence or presence of sporodochia and chlamydospores. The main results were: Of the total of 29 isolates, 13 corresponded to the *Fusarium fujikuroi* species complex, seven to the *Fusarium oxysporum* species complex, three to the *Fusarium incarnatum* species complex and three to the *Fusarium graminearum* species complex, the others were identified as *Fusarium* sp. Chapter 3 "Biological control of *Fusarium* spp. by *Trichoderma atroviride* in pinus seeds" aims to test fungi of the genus *Trichoderma* of forest seeds on their potential of control of *Fusarium* in pinus seeds and to evaluate the capacity of the same ones to promote the Initial seedling growth. The main results were: *Trichoderma atroviride* inhibited the mycelial growth of *Fusarium* spp. *in vitro* and promoted the initial growth of pinus seedlings. Chapter 4 "Biological control of *Fusarium* spp. By bacilos in pinus seeds" aims to test endophytic bacteria of forest seeds for their potential to control *Fusarium* spp. in pinus seeds and to evaluate their capacity to promote initial seedling growth. The main results were: - *Bacillus* sp., *Bacillus velezensis*, *Bacillus methylotrophicus* and *Paenibacillus polymyxa* inhibited the mycelial growth of *Fusarium meridionale*, *Fusarium fujikuroi* complex isolate, *Fusarium oxysporum* and *Fusarium* sp. ; There

was no effect of endophytic bacteria on the *in vivo* control and on the promotion of initial growth of *P. taeda* and *P. elliottii* var. *elliottii* seedlings.

Keywords: Seed pathology; *Fusarium* spp.; forest species; *Trichoderma* spp; endophytic bacteria.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	10
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	12
2. REFERÊNCIAS.....	14
Capítulo 1 - <i>Fusarium</i> spp. EM SEMENTES DE ESPÉCIES DE PINUS TROPICAIS E SUBTROPICAIS NO BRASIL	16
1. INTRODUÇÃO	17
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4. CONCLUSÕES	23
5. REFERÊNCIAS.....	24
Capítulo 2 - CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E MORFOLÓGICA DE ISOLADOS DE <i>Fusarium</i> spp. PROVENIENTES DE SEMENTES DE PÍNUS NO BRASIL.....	31
1. INTRODUÇÃO	32
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
2.1 Caracterização molecular.....	34
2.2 Análise filogenética	35
2.3 Caracterização morfológica.....	36
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4. CONCLUSÕES	48
5. REFERÊNCIAS.....	49
Capítulo 3 – CONTROLE BIOLÓGICO DE <i>Fusarium</i> spp. POR <i>Trichoderma atroviride</i> EM SEMENTES DE PÍNUS.	53
1. INTRODUÇÃO	55
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	56

2.1 Isolamento de <i>Trichoderma</i> spp.	56
2.2 Antagonismo em culturas confrontadas	57
2.3 Tratamento de sementes de pinus contaminadas com <i>Fusarium meridionale</i> e um isolado pertencente ao complexo <i>F. fujikuroi</i> , com <i>Trichoderma atroviride</i>	57
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
4. CONCLUSÕES	67
5. REFERÊNCIAS.....	67
Capítulo 4 - CONTROLE BIOLÓGICO DE <i>Fusarium</i> spp. POR BACILOS EM SEMENTES DE PÍNUS.....	70
1. INTRODUÇÃO	72
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	73
2.1 Isolamento de bactérias endofíticas	73
2.2 Antagonismo em culturas confrontadas	73
2.3 Tratamento com bactérias endofíticas de sementes de pinus contaminadas com <i>Fusarium</i>	75
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
4. CONCLUSÕES	81
5. REFERÊNCIAS.....	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Árvore de máxima parcimônia de espécies de <i>Fusarium</i> baseada em sequências parciais do gene EF-1 α . O comprimento dos ramos é indicado por escala na base da árvore, e os valores de bootstrap (1000 repetições) são indicados em percentagem acima dos internódios. Esta árvore tem como raiz <i>F. illudens</i> . CI = 0.78; RI = 0.89.....	39
Figura 2.2 - Árvore de Máxima parcimônia de espécies de <i>Fusarium</i> baseada em sequências parciais do gene RPB2. O comprimento dos ramos é indicado por escala na base da árvore, e os valores de bootstrap (1000 repetições) são indicados em percentagem acima dos internódios. Esta árvore tem como raiz <i>F. illudens</i> . CI = 0.75; RI = 0.87.....	40
Figura 2.3 - Característica cultural de isolados de <i>Fusarium</i> spp. provenientes de sementes de <i>Pinus</i> spp. cultivados em meio BDA. A: <i>F. incarnatum – equiseti</i> ; B: <i>F. oxysporum</i> ; C: <i>F. andiyazi</i> ; D: <i>F. graminearum</i> ; E: <i>F. meridionale</i> ; F: <i>F. proliferatum</i> ; G: <i>F. verticillioides</i> ; H: complexo <i>F. fujikuroi</i> ; I: <i>Fusarium</i> sp.	42
Figura 2.4 - Características morfológicas de macro conídios de <i>Fusarium</i> spp. em meio CLA. A: <i>Fusarium incarnatum – equiseti</i> . B: <i>F. oxysporum</i> .; C: <i>F. fujikuroi</i> ; D: <i>F. andiyazi</i> . E <i>F. meridionale</i> . F: <i>F. graminearum</i>	42
Figura 2.5 - Características morfológicas de microconídios de <i>Fusarium</i> spp. em meio CLA. A: <i>Fusarium fujikuroi</i> A1 – Microconídios. A2 – polifialide; B: <i>F. verticillioides</i> . B1 – microconídios; B2 – formação de microconídios em cadeias longas C: microconídios de <i>F. oxysporum</i> . D: <i>F. proliferatum</i> . D1 – microconídios, D2 – microconídios em cadeias curtas; E: <i>F. andiyazi</i> . E1 – microconídios; E2 – polifialides; E3 – formação de microconídios em falsas cabeças.....	43
Figura 2.6 - Formação de esporodóquio.	44
Figura 2.7 - Características morfológicas (clamidósporos) de <i>Fusarium</i> spp. em meio CLA. A: <i>Fusarium fujikuroi</i> . B: <i>F. meridionale</i> . C: <i>Fusarium</i> sp. D: <i>F. oxysporum</i> . E: <i>F. incarnatum – equiseti</i>	45
Figura 3.1 - Ensaio pareamento de <i>Trichoderma atroviride</i> com <i>Fusarium</i> spp. A: <i>Trichoderma</i> spp. crescendo sobre a colônia de <i>Fusarium</i> spp. indicado pela seta. B: Testemunha.	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 - Origem dos isolados de <i>Fusarium</i> spp. em cada lote de sementes de pínus, detectados pelos testes de detecção em sementes (DS) e detecção em plântulas (DP).....	27
Tabela 1.2 - Incidência (%) de <i>Fusarium</i> spp. em pínus subtropicais (lotes 1 a 14) e tropicais (lotes 15 a 26), pelo método de Detecção em Sementes (DS) e Detecção em Plântulas (DP).	28
Tabela 1.3 - Emergência (%) e tombamento (%) de plântulas de pínus subtropicais (<i>Pinus taeda</i> , <i>P. elliottii</i> var. <i>elliottii</i>) e tropicais (<i>P. maximinoi</i> , <i>P. caribaea</i> var. <i>hondurensis</i> e <i>P. oocarpa</i>), com inoculação prévia de <i>Fusarium</i> spp. nas sementes, aos 28 dias após a semeadura.	29
Tabela 1.4 - Caracterização patogênica de <i>Fusarium</i> spp. detectados em sementes (DS) ou em plântulas (DP), causadoras de tombamento de plântulas em <i>Pinus</i> spp..	30
Tabela 2.1 - Patogenicidade de isolados de <i>Fusarium</i> detectados em sementes de pínus no Brasil.....	34
Tabela 2.2 - Identificação de espécies de <i>Fusarium</i> por meio da região fator de alongação 1 – alfa (EF - 1 α) e a segunda maior subunidade da RNA polimerase (RPB2), utilizando-se o banco de dados Fusarium-ID.....	37
Tabela 2.3 - Caracterização morfológica de <i>Fusarium</i> spp. provenientes de sementes de <i>Pinus</i> spp., cultivados em meio de folha de cravo agar (FCA).	47
Tabela 3.1 - Taxa de inibição do crescimento micelial de <i>Fusarium fujikuroi</i> (isolados FPM2, FPO e FPE3), <i>Fusarium meridionale</i> (isolado FPT20) e <i>F. oxysporum</i> (isolado FPC1) por <i>Trichoderma</i> sp. em meio BDA, a 24 °C, com fotoperíodo de 12 h, por sete dias.....	60
Tabela 3.2 - Emergência (%) de plântulas e porcentagem de plântulas doentes (%) oriundas de sementes de pínus contaminadas com <i>Fusarium meridionale</i> e <i>Fusarium fujikuroi</i> e tratadas com <i>Trichoderma atroviride</i>	64
Tabela 3.3 - Diâmetro de coleto (Dc em mm), comprimento de parte aérea (CA em cm), Peso Seco de parte Aérea (PSA em mg), Comprimento Radicular (CR em cm), Peso Seco de Parte Radicular (PSR em mg), Relação CA/Dc, Relação Dc/CA e índice de Qualidade de Dickson (IQD) de plântulas de pínus oriundas de sementes contaminadas com <i>Fusarium</i> spp., tratadas com <i>Trichoderma atroviride</i>	66
Tabela 4.1 - Taxa de inibição do crescimento micelial de <i>Fusarium fujikuroi</i> (isolados FPM2, FPO e FPE3), <i>Fusarium meridionale</i> (isolado FPT20) e <i>F. oxysporum</i> (isolado FPC1) por bactérias endofíticas, em meio King B, a 24 °C, com fotoperíodo de 12 h, por sete dias.....	77

Tabela 4.2 - Emergência (%) de plântulas e porcentagem de plântulas doentes (%) oriundas de sementes de pinus contaminadas com *Fusarium meridionale* e *Fusarium fujikuroi* e tratadas com bactérias endofíticas.....79

Tabela 4.3 - Diâmetro de coleto (Dc em mm), comprimento de parte aérea (CA em cm), Peso Seco de parte Aérea (PSA em mg), Comprimento Radicular (CR em cm), Peso Seco de Parte Radicular (PSR em mg), Relação CA/Dc, Relação Dc/CA e índice de Qualidade de Dickson (IQD) de plântulas de pinus oriundas de sementes contaminadas com *Fusarium* spp., tratadas com bactérias endofíticas80

1. INTRODUÇÃO GERAL

O pínus (*Pinus* spp.), família Pinaceae, ocorre naturalmente no hemisfério norte de clima temperado possuindo mais de 100 espécies dentre as quais, *Pinus taeda* Lineu e *P. elliottii* var. *elliottii* var. *elliottii* Engelm. são as espécies mais cultivadas na região subtropical do Brasil pelas características de resistência a geadas e altos rendimentos em madeira; e espécies tropicais como *P. tecunumanii* Eguluz e Perry, *P. caribaea* var. *hondurensis*, *P. oocarpa* Schiede, *P. patula* Schltdl & Cham e *P. maximinoi* H. E. Moore, apresentam potencial na produção de resinas e madeira em regiões livres de geadas (SHIMIZU, 2008).

O cultivo de pínus no Brasil iniciou-se na década de 1960 com a lei de incentivos fiscais buscando suprir a demanda por produtos madeireiros e, consequentemente, diminuindo a exploração de florestas nativas (ANDRADE, 1960, SHIMIZU, 2008). A área plantada atual é de 1,6 milhões de hectares, alcançando uma produtividade de 31 m³/ha/ano. Os principais estados brasileiros produtores de pínus estão localizados na região Sul e Sudeste do Brasil, sendo eles: Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, São Paulo e Minas Gerais, sendo o Paraná o de maior área plantada com cerca de 0,7 milhão de hectares (IBÁ, 2016).

A produção de mudas de pínus é realizada por meio de sementes e estas devem apresentar elevada qualidade fisiológica e sanitária (VIEIRA & CARVALHO, 1994). Sementes vigorosas apresentam rápida, elevada e uniforme germinação e devem ser livres de patógenos (BRASIL, 2013). No entanto, as sementes de pínus podem ser veículos de disseminação de fitopatógenos (BRASIL, 2009).

O gênero *Fusarium* é um dos principais fitopatógenos relatados em associação com sementes de espécies florestais (SANTOS *et al.*, 2011). Este fungo é responsável por danos em sementes, afetando a germinação, ou podem ser transmitidos para as mudas, causando podridão radicular e tombamento de plântulas (SANTOS & PARISI, 2011). No Brasil, fungos deste gênero foram descritos em associação com sementes de aproximadamente 100 espécies florestais (SANTOS & REGO, 2011) e identificados como causadores de tombamento em mudas de espécies nativas como Umbu (*Phytolacca dioica* L.) e cedro (*Cedrella fissilis* Vellozo) e exóticas como acácia negra (*Acacia mearnsii* DeWild.) e pínus (*Pinus* spp.) (AUER & SANTOS, 2011; SANTOS & PARISI, 2011).

Ainda são poucos os estudos sobre detecção de *Fusarium* em sementes florestais, mas pode-se afirmar que são patógenos veiculados por meio destas, como relatado por Maciel (2012) que detectou *Fusarium sambucinum* Fuckel s. st. em sementes de *P. elliotii* var. *elliotii* e por Silva (2013) que detectou *Fusarium subglutinans* Wollenw. & Reinking; P.E.Nelson et al. em *P. taeda*. Em ambos os trabalhos foi verificada a patogenicidade desses fungos causando redução na germinação e amarelecimento das acículas, murcha e morte de plântulas.

Dentre as espécies do gênero, *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell, é a principal espécie na cultura do pínus que pode, além de causar podridão radicular e tombamento de plântulas, causar o cancro resinoso do pinheiro, que representa uma séria ameaça às plantações de pínus por reduzir o crescimento e qualidade da madeira, além de causar a mortalidade de árvores (DWINNEL *et al.*, 1977; WINGFIELD *et al.*, 2008). Destaca-se, dessa forma, a necessidade de maior atenção e cuidados para que este patógeno não seja introduzido no País, principalmente por meio de sementes contaminadas, uma vez que é transmitido por sementes e a importação das sementes é uma prática comum para atender a demanda crescente da cultura para a indústria de papel e celulose e madeira (AUER & SANTOS, 2011).

A detecção de patógenos nocivos presentes em sementes florestais é de grande relevância, pois proporciona informações que podem auxiliar na tomada de decisão para o manejo da doença. Para isso, algumas alternativas de controle têm sido utilizadas, como o uso de micro-organismos benéficos, tais como fungos do gênero *Trichoderma* sp. e bactérias endofíticas. Maciel *et al.* (2014) verificaram que tanto *Trichoderma* sp. quanto *Bacillus* sp. foram eficientes no controle de *F. sambucinum* e que a bactéria foi eficiente na promoção do crescimento de plântulas de *P. elliotii* var. *elliotii*. Lima *et al.* (2014) também verificaram o antagonismo de *Bacillus* sp. sobre o crescimento micelial de *F. oxysporum*.

Diante disso, este trabalho trata de novas abordagens sobre a associação patogênica de *Fusarium* spp. com sementes de espécies de pínus cultivados no Brasil, enfocando a detecção, patogenicidade, identificação e controle biológico de *Fusarium* spp. A tese foi agrupada em quatro capítulos, conforme segue: Capítulo. 1 “*Fusarium* spp. em sementes de pinus tropicais e subtropicais no Brasil”; Capítulo. 2 “Caracterização morfológica e molecular de isolados de *Fusarium* spp. de sementes de pínus no Brasil”; Capítulo. 3 “Controle biológico de *Fusarium* e promoção do

crescimento de pinus com *Trichoderma atroviride*"; Capítulo. 4 "Controle biológico de *Fusarium* e promoção do crescimento de pinus por bactérias endofíticas".

2. REFERÊNCIAS

ANDRADE, E. N. **O eucalipto**. Companhia paulista de estradas de ferro. 2 ed. Jundiaí, São Paulo, 664p. 1961.

AUER, C.G.; SANTOS, A.F. dos Detecção de *Fusarium* em sementes de pinus. In: SANTOS, A.F. dos; PARISI, J.J.D.; MENTEN, J.O.M.(Eds). Patologia de Sementes Florestais. **EMBRAPA Florestas**, p.63-67, 2011.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instruções para análise de sementes de espécies florestais**, de 17 de janeiro de 2013, Brasília: MAPA. 98 p. 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de análise sanitária de sementes**. Brasília, p. 202. 2009.

CARNEIRO, J.S. Teste de sanidade de sementes de essências florestais. **Patologia de sementes**, p.390-391, 1987.

DHINGRA, O.D.; MUCHOVEJ, J.J.; CRUZ FILHO, J. **Tratamento de sementes (controle de patógenos)**. Viçosa: UFV, Imprensa Universitária, p.121, 1980.

DWINELL, L.D.; PHELPS, W.R. Pitch canker of slash pine in Florida. **Journal of Forestry**, v.75, p.488-489, 1977.

INDUSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES (IBÁ). **Relatório Ibá 2016**. Brasília, 2016. 64 p.

LIMA, O. D. R.; OLIVEIRA, L. J. M. G.; SILVA, M. S. B. S.; RODRIGUES, A. A. C. Ação antifúngica *in vitro* de isolados de *Bacillus* spp. sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Revista Caatinga**. Mossoró. v.27, n.4, p. 57-64. 2014.

MACHADO, J.C. **Patologia de sementes: fundamentos e aplicações**. Brasília: MEC / ESALQ / FAEPE, p.106, 1988.

MACIEL, C. G. ***Fusarium sambucinum* associado a sementes de *P. elliottii* var. *elliottii*: patogenicidade, morfologia, filogenia molecular e controle**. 2012. 94f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS. 2012.

MACIEL, C.G.; WALKER, C.; MUNIZ, M. F. B.; ARAÚJO, M. M. Antagonismo de *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis* (UFV3918) a *Fusarium sambucinum* em *P. elliottii* var. *elliottii* Engelm. **Revista Árvore**. Viçosa- MG, v.38, n.3, p. 505 – 512. 2014.

MIROV, N.T. **The Genus *Pinus***. New York: Ronald Press. 602p. 1967.

NASCIMENTO, W.M.O.; CRUZ, E.D.; MORAES, M.H.; MENTEN, J.O.M. Qualidade sanitária e germinação de sementes de *Pterogyne nitens* Tull. (Leguminosae-Caesalpinioideae). **Revista Brasileira de Sementes**, v.28, n.1, p.149-153, 2006.

PARISI, J.J.D. **Associação entre fungos e a viabilidade de embriões de *Inga vera* subsp. *Affinis* (DC.) TD Penn. Durante o armazenamento**. 2012. 98 f. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) - Universidade Estadual de Campinas, Campina, São Paulo, 2012.

SANTOS, A.F. dos; PARISI, J.J.D. Doenças em mudas e tipos de associação entre fungos e sementes de espécies florestais. In: **SANTOS, A.F. dos; PARISI, J.J.D.; MENTEN, J.O.M. Patologia de Sementes Florestais**. EMBRAPA Florestas, p.37-48, 2011.

SANTOS, A.F. dos; PARISI, J.J.D.; MENTEN, J.O.M. Importância da sanidade das sementes florestais. In: **SANTOS, A.F.; PARISI, J.J.D.; MENTEN, J.O.M. Patologia de Sementes Florestais**. EMBRAPA Florestas, p.11-13, cap.1, 2011.

SANTOS, A.F. dos; REGO, S.S. Hospedeiros, métodos de detecção e fungos encontrados em sementes florestais. In: **SANTOS, A.F. dos; PARISI, J.J.D.; MENTEN, J.O.M. Patologia de Sementes Florestais**. EMBRAPA Florestas, p.115-188, cap.9, 2011.

SHIMIZU, J.Y. **Pínus na silvicultura brasileira**. Embrapa Florestas. Colombo, PR. 223p. 2008.

SILVA, T. W. R. **Associação de *Fusarium* spp. com sementes de *P. taeda*: detecção, transmissão, patogenicidade e biocontrole**. 2013. 98 f. Dissertação (mestrado em ciências agrárias) – Programa de pós-graduação em agronomia – produção vegetal, setor de ciências agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2013.

VIEIRA, R. D.; CARVALHO, N. M. **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP. 164p. 1994.

WINGFIELD M. J., HAMMERBACHER A., GANLEY R. J., STEENKAMP E. T., GORDON T. R., WINGFIELD B. D., COUTINHO T. A. Pitch canker caused by *Fusarium circinatum* – a growing threat to pine plantations and forests worldwide. **Australasian Plant Pathology**, 37, p.319-334. 2008. doi:10.1071/AP08036.

Capítulo 1 - *Fusarium* spp. EM SEMENTES DE ESPÉCIES DE PINUS TROPICAIS E SUBTROPICAIS NO BRASIL

RESUMO - A produção de mudas de *Pinus* spp. é realizada por meio de sementes, sendo esta um veículo de disseminação de patógenos, especialmente espécies de *Fusarium*. Objetivou-se com este trabalho detectar *Fusarium* spp. em 26 lotes de sementes de pinus tropicais e subtropicais oriundos das principais regiões brasileiras produtoras de pinus, avaliar a sua transmissão e patogenicidade. Para detecção de *Fusarium* spp. utilizou-se a detecção em semente (DS) em meio seletivo e transmissão da semente para plântula (DP). As espécies de *Fusarium* spp. encontradas por meio dos testes de DS e DP foram: *F. oxysporum*, espécies do complexo *F. fujikuroi*, *F. proliferatum*, *F. verticillioides*, *F. graminearum*, *F. incarnatum-equiseti*, *F. meriodionale*, *F. andyazi* e *Fusarium* sp. O teste de patogenicidade foi realizado pelo contato direto das sementes desinfestadas com a cultura de *Fusarium* em meio batata-dextrose-ágar. Após, as sementes foram semeadas em vermiculita, avaliando-se a emergência. Dos 26 lotes avaliados, 19,2% apresentaram *Fusarium* spp. detectados por DS e 23,1% por DP. *Fusarium* spp. causaram tombamento de plântulas em *P. taeda*, *P. elliottii* var. *elliottii*, *P. maximinoi* e *P. oocarpa* e afetaram a germinação de sementes de *P. caribaea* var. *hondurensis*.

Palavras-chave: sementes florestais, patologia de sementes.

Chapter 1 - *Fusarium* spp. IN TROPICAL AND SUBTROPICAL PINUS SEEDS IN BRAZIL

ABSTRACT - The production of *Pinus* spp. seedlings is achieved through the use of seeds which are a vehicle for pathogen dissemination, especially species of *Fusarium*. The aim of this study was to detect *Fusarium* spp. in 26 lots of tropical and subtropical pinus seeds and evaluate its pathogenicity. For the detection of *Fusarium* spp. on seeds (DS), the selective media was used and the transmission test was performed, described as detection in plants (DP). The *Fusarium* species obtained from DS test and DP test were: *F. oxysporum*, *F. fujikuroi* complex, *F. proliferatum*, *F. verticillioides*, *F. graminearum*, *F. incarnatum-equiseti*, *F. meriodionale*, *F. andyazi* e *Fusarium* sp. The pathogenicity test was made through direct contact of the disinfested seeds with the *Fusarium* spp. culture grown in potato-dextrose-agar. The seeds were sown in vermiculite and the emergence was evaluated 28 days after the sowing. From the 26 lots, 19,2% showed the presence of *Fusarium* spp. in MS test and 23,1% in DP test. *Fusarium* spp. were able to cause damping-off of *P. taeda*, *P. elliottii* var. *elliottii*, *P. maximinoi*, and *P. oocarpa* and also affected *P. caribaea* var. *hondurensis* germination.

Keywords: tree seeds, seed pathology.

1. INTRODUÇÃO

Os plantios de pinus (*Pinus* spp.) no Brasil são tidos como rústicos e, em parte, resistentes às doenças (AUER *et al.*, 2001). Embora haja esforços para o uso da clonagem na produção de mudas de pinus, o processo ainda ocorre pelo uso de sementes (MACIEL *et al.*, 2013). A sanidade e a qualidade das sementes utilizadas são muito importantes na propagação de pinus e, mesmo assim, estas características são pouco estudadas.

Dentre os principais fitopatógenos associados às sementes de pinus está o gênero *Fusarium* que também ocorre em sementes de outras espécies arbóreas (LORI & SALERNO, 2003; BENETTII *et al.*, 2009; LAZAROTTO *et al.*, 2012). O tombamento de pré e pós-emergência são as principais doenças observadas quando há *Fusarium* associado às sementes (AUER *et al.*, 2001; LAZREG *et al.*, 2013; HAIDER *et al.*, 2014; LAZREG *et al.*, 2014a; LAZREG *et al.*, 2014b). Além do tombamento, outra doença de pinus transmitida por sementes é o cancro resinoso, causado por *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell que é considerado uma praga quarentenária para o país (MACIEL *et al.*, 2013; PFENNING *et al.*, 2014).

Em termos mundiais, *F. circinatum* é a espécie que tem causado mais danos aos plantios e a produção de mudas de pinus (WINGFIELD *et al.*, 2002; ALONSO & BETTUCCI, 2009; STEENKAMP *et al.*, 2012). Embora no Brasil seja considerada uma praga quarentenária (BRASIL, 2008), já foi interceptado em mudas seminais no estado de Santa Catarina (PFENNING *et al.*, 20014). Outras espécies como *F. oxysporum* Schlechtendahl emend. Snyder & Hansen, *F. solani* (Martius) Appel & Wollenweber emend. Snyder & Hansen, *F. parvisorum* Herron, Marinc. & M.J. Wingf., *F. falciforme* (Carrion) Summerb. & Schroers e *F. subglutinans* (Wollenweber & Reinking) Nelson, Toussoun & Marasas, também são importantes patógenos associados às sementes da cultura (HUANG, 1990; HERRON *et al.*, 2015).

No Brasil, há poucos registros sobre a associação patogênica de *Fusarium* spp. às sementes de pinus. Há apenas registros feitos por Homechin *et al.* (1986) para *F. oxysporum* em *P. elliottii* var. *elliottii*, por Maciel *et al.* (2013) para *F. sambucinum* Fückel *sensu stricto* em *P. elliottii* var. *elliottii* e por Silva (2013) para *Fusarium* sp. em *P. taeda*.

Devido à importância da cultura do pinus para o Brasil, atualmente com 1,6 milhões de hectares plantados (IBÁ, 2016), e os riscos da ocorrência de fusariose na

produção de mudas, o presente trabalho objetivou detectar e avaliar a patogenicidade de *Fusarium* spp. em lotes de sementes comerciais de seis espécies de pinus tropicais e duas de pinus spp. subtropicais, advindas das principais regiões produtoras brasileiras.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Origem das sementes. Foram utilizados 26 lotes de sementes comerciais de oito espécies de *Pinus*: seis de pinus tropicais (*Pinus maximinoi* H. E. Moore, *P. greggii* Engelm, *Pinus tecunumanii* Eguluz & Perry, *Pinus patula* Schiede et. Deppe, *P. caribaea* var. *hondurensis* var. *hondurensis* var. *caribaea* Morelet. e *Pinus oocarpa* Sciede.) e duas de pinus subtropicais (*Pinus taeda* Linneu. e *P. elliottii* var. *elliottii* var. *elliottii* Engelm.) oriundos das principais regiões brasileiras produtoras, sendo dois lotes do estado de Minas Gerais, seis de São Paulo, 14 do Paraná e quatro de Santa Catarina (Tabela 1.1). As sementes foram mantidas em câmara fria com temperatura média de 4°C até a realização dos experimentos.

Experimento 1 - Detecção de Fusarium spp. em sementes (DS). Foram preparadas placas de Petri com meio seletivo (MS) para *Fusarium*, conforme Auer e Santos *et al.* (2011). Retirou-se uma amostra de 100 sementes de cada lote, que foram esmagadas com bastão de vidro e depositadas nas placas de Petri com MS. Utilizou-se 20 placas de Petri com cinco sementes para cada uma e incubou-se a 20°C, com foto período de 12 h por 14 dias.

Após a incubação, a superfície do meio de cultura de cada placa foi examinada em binocular estereoscópio e em microscópio de luz para visualização das estruturas típicas de *Fusarium* spp. Em seguida, procedeu-se o isolamento, repicando-se fragmentos de inóculo fungico para placas de Petri contendo meio batata-dextrose-agar (BDA), e incubando-as a 24 °C, no escuro, por sete dias. Os isolados de *Fusarium* spp. obtidos foram repicados para tubos de ensaio contendo meio BDA e, posteriormente, preservados pelo método Castellani (Capriles, 1989) para testes posteriores.

Experimento 2 – Detecção de Fusarium spp. em plântulas (DP). Procedeu-se a semeadura de 100 sementes de cada lote, sem desinfestá-las, em bandejas de isopor, tendo como substrato vermiculita esterilizada. A irrigação foi feita

manualmente, de uma a duas vezes ao dia, com volume de aproximadamente 15 mL por célula. As bandejas foram mantidas em casa de vegetação.

Aos 28 dias após a semeadura (DAS), avaliou-se a emergência de plântulas, quantificando-se as plântulas sadias e sintomáticas. As plântulas que apresentaram sintomas foram arrancadas e desinfestadas em álcool 70% (v/v) por 30 s, seguido de hipoclorito de sódio 1% (v/v) por um minuto e lavadas em água ultrapurificada esterilizada. Cada plântula foi colocada em placa de Petri contendo meio BDA acrescida dos antibióticos ($40 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de ampicilina e $80 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de cloranfenicol). As placas de Petri foram mantidas em condições de ambiente de laboratório, por sete dias. As colônias de *Fusarium* spp. que cresceram nas amostras de pinus foram repicadas para placas de Petri contendo meio BDA.

Os isolados de *Fusarium* spp. oriundos dos experimentos DS e DP foram identificados segundo metodologia de Leslie e Summerell (2006) e O'Donnell *et al.* (1998), que consistiram em análise molecular, por meio da amplificação da região fator de elongação 1-alfa. Para a extração de DNA foi utilizado o kit Wizard® Genomic DNA Purification da Promega. As amostras do DNA genômico foram submetidas à PCR. Os fragmentos foram sequenciados em sequenciador Mega BACE 500 (Amershan) e as sequências foram comparadas utilizando-se o banco de dados Fusarium-ID. Foram feitas culturas monospóricas de cada isolado obtido nos testes DS e DP.

Experimento 3 - Teste de patogenicidade de Fusarium sp. em sementes de pinus. Para o teste de patogenicidade, foram usados os 29 isolados de *Fusarium* spp., provenientes dos testes DS e DP, os quais foram repicados para placas de Petri contendo meio BDA, incubando-as por 24 °C, em foto período de 12 h, por sete dias. Posteriormente, as sementes de *P. taeda*, *P. elliottii* var. *elliottii*, *Pinus maximinoi*, *Pinus oocarpa* e *P. caribaea* var. *hondurensis* foram submetidas a desinfestação em álcool 70% (v/v) por um min, hipoclorito de sódio 1% (v/v) por três min e lavadas em água ultrapurificada esterilizada. As sementes foram inoculadas colocando-as em contato com a cultura fúngica, por 48 h. Não se procedeu inoculações cruzadas, assim os isolados foram testados de acordo com a espécie de *Pinus* a qual foi isolado. Colocou-se 50 sementes, com a quebra de dormência já realizada, por isolado e a testemunha foi constituída por sementes depositadas em placas de Petri contendo somente meio BDA. Após o período de inoculação, procedeu-se a semeadura em bandejas de isopor contendo vermiculita, sendo

colocada uma semente por célula, obtendo-se cinco repetições de 10 sementes por isolado.

A avaliação do teste de patogenicidade foi realizado por meio da emergência das plântulas, quantificando-se as plântulas sintomáticas, caracterizadas por tombamento pré e pós emergência.

As plântulas sintomáticas foram coletadas e, em seguida, desinfestadas em álcool 70% (v/v) por 30 s, hipoclorito de sódio 1% (v/v) por um min e lavadas em água ultrapurificada esterilizada. Posteriormente, as plântulas foram colocadas em placas de Petri com meio MS e incubadas em ambiente de laboratório. As sementes não germinadas foram coletadas e colocadas em câmara úmida, para facilitar a colonização fúngica e posterior observação das estruturas fúngicas e reisolamento.

Delineamento experimental. Para todos os testes o delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) e, quando pertinentes as médias foram comparadas pelo teste de Tukey com intervalo de confiança de 95% utilizando-se o *software Assistat*. Em relação às sementes de *P. oocarpa*, utilizou-se o teste T, devido ao número de isolados fúngicos obtidos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A associação patogênica de *Fusarium* spp. às sementes de pinus tropicais e subtropicais e a sua transmissão das sementes para plântulas foi demonstrada.

Dos 26 lotes de sementes comerciais de pinus tropicais e subtropicais, 11 apresentaram incidência de *Fusarium* spp. variando de 1 a 6% de sementes de *P. taeda*, *P. elliottii* var. *elliottii*, *P. maximinoi*, *P. oocarpa*, *P. caribaea* var. *hondurensis* infectadas sendo que, os lotes das espécies de *P. greggii*, *P. patula* e *P. tecunumannii* e alguns lotes de *P. taeda*, *P. elliottii* var. *elliottii*, *P. maximinoi* e *P. caribaea* var. *hondurensis* não apresentaram *Fusarium* spp. (Tabela 1.1). A partir dos dois métodos utilizados – DS e DP – foram isolados fungos do gênero *Fusarium*, sendo que através do método DS e DP foram isolados os fungos alvo das duas espécies de pinus subtropicais (*P. taeda* e *P. elliottii* var. *elliottii*) e pelo DP foram isolados fungos do gênero *Fusarium* de três espécies distintas de pinus tropicais (*P. maximinoi*, *P. caribaea* var. *hondurensis* e *P. oocarpa*).

Os maiores valores de detecção pelo método DS foram verificados nas espécies subtropicais, no lote 4 de *P. taeda*, atingindo 5% (Tabela 1.1).

Pelo método DP verificou-se uma variação de 1 a 6% de incidência, sendo que, os maiores valores de plântulas tombadas foram observados nas espécies subtropicais no lote 5 de *P. taeda* os quais apresentaram 6% de plântulas com *Fusarium* sp. Entre as espécies tropicais, a variação foi de 1 a 2% de incidência (Tabela 1.1).

Foram obtidos 29 isolados de *Fusarium* spp., sendo 24 de pinus subtropicais e 5 de pinus tropicais: 19 isolados de *P. taeda*, 5 de *P. elliottii* var. *elliottii*, 2 de *P. maximinoi*, 2 de *P. caribaea* var. *hondurensis* e um isolado de *P. oocarpa* (Tabela 1.2).

As espécies *F. graminearum*, *F. oxysporum*, isolados do complexo *F. fujikuroi*, *F. meridionale* e *Fusarium andiyazi* foram patogênicas para os pinus subtropicais. Para os pinus tropicais observou-se apenas a patogenicidade de isolados do complexo *F. fujikuroi*, *F. oxysporum* e *Fusarium* sp. As espécies *F. proliferatum*, *F. incarnatum-equiseti* e *F. verticillioides* não foram patogênicas.

No teste de patogenicidade em *P. taeda*, a emergência de plântulas variou de 2 a 28 %. Já para tombamento de plântulas, variou de 0 a 22%. 30% dos isolados foram capazes de causar tombamento pré e pós emergência, com incidência variando de 0 a 22%, sendo o isolado identificado como *F. meridionale* (FPT20) o de maior incidência (Tabela 1.3). Enquanto que, para *P. elliottii* var. *elliottii*, todos os isolados foram patogênicos, com incidência variando de 20 a 40%, sendo o isolado FPE3 (complexo *F. fujikuroi*) o que atingiu o maior número de plântulas (Tabela 1.3).

Há poucos relatos no Brasil da associação patogênica das espécies *F. oxysporum* e *F. meridionale* com sementes de pinus, especialmente em *P. taeda*, como demonstrado neste trabalho, podendo este ser o primeiro relato de *F. meridionale* associado ao pinus no Brasil. *Pinus taeda* é a espécie de pinus mais cultivada no Brasil (IBÁ, 2016). Em 1986, Homechin *et al.* (1986) verificaram a presença de *F. moniliforme*, *F. oxysporum* e *F. semitectum* em sementes de *P. elliottii* var. *elliottii* e *F. oxysporum* em sementes de *P. taeda*. No entanto, estes autores comprovaram a patogenicidade apenas de *F. oxysporum* em plântulas de *P. elliottii* var. *elliottii*.

Maciel *et al.* (2013) detectaram *F. sambucinum* em sementes de *P. elliottii* var. *elliottii* e demonstraram a sua transmissão para plântulas, causando tombamento de pré e pós emergência. Na Argentina, Lori e Salerno (2003) encontraram seis espécies de *Fusarium*: *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. equiseti*, *F. acuminatum*, *F.*

incarnatum, *F. proliferatum* e *F. verticillioides* associados às sementes de *P. taeda* e *P. elliottii* var. *elliottii*, dentre as quais somente *F. proliferatum* e *F. graminearum* não foram patogênicas. Estes resultados assemelham-se aos observados no presente trabalho, demonstrando que *Fusarium* spp. associados às sementes de pinus podem ser transmitidas para plântulas e causar tombamento pré e pós-emergência.

Com relação a *P. maximinoi*, os isolados de *Fusarium* spp. FPM1 e FPM2 interferiram na emergência das plântulas e, entre os dois isolados, o FPM2 (complexo *F. fujikuroi*) foi o que causou maiores valores para tombamento (25%) (Tabela 1.3).

Entre os pinus tropicais, *P. caribaea* var. *hondurensis* foi a única espécie em que não houve emergência de plântulas, e portanto, não foi possível verificar se os isolados FPC1 e FPC2 são patogênicos (Tabela 1.3), sabendo-se que os dados de germinação do lote de *P. caribaea* var. *hondurensis* era de 89,5%. Esse baixo índice de germinação apresentado no teste de patogenicidade tanto pela testemunha quanto para os tratamentos com *Fusarium* sp. tem sido observado no Laboratório de Sementes Florestais da Embrapa Florestas pela perda de umidade, quando as sementes são armazenadas por longo período de tempo, o que pode ter sido o fator causal da baixa germinação para essa espécie. Em *P. oocarpa*, a patogenicidade foi verificada com o isolado do complexo *Fusarium fujikuroi* (FPO) que causou tombamento pós-emergência, com incidência de 42% de plântulas tombadas (Tabela 1.3).

Este trabalho constitui-se no primeiro relato da associação patogênica entre espécie de *Fusarium* spp. com espécies de pinus subtropicais e tropicais no Brasil (Tabela 1.4).

Em relação aos pinus tropicais, em outras regiões, como na África, para *P. caribaea* var. *hondurensis*, Hocking (1968) observou a associação de *F. moniliforme* e *F. oxysporum* com sementes e mudas desta espécie. Na Colômbia também foi verificado a associação de *F. circinatum* com *P. maximinoi*, *P. tecunumanii* e *P. patula* (STEENKAMP *et al.*, 2012).

No Brasil, a associação de *Fusarium* spp. com sementes de pinus limitam-se às espécies de pinus subtropicais, em que *F. oxysporum*, o complexo *F. fujikuroi*, *F. proliferatum* e *F. verticillioides* já foram relatadas e comprovado a patogenicidade (MACIEL *et al.*, 2013; PFENNING *et al.*, 2014; SILVA, 2013; HOMECHIN *et al.*, 1986).

A incidência de tombamento variou de 0 a 42% das plântulas emergidas. Grigoletti Júnior *et al.* (2006) também avaliaram a patogenicidade de *Fusarium* sp. em *P. taeda* e obtiveram incidência de 48% e 60%. Isto pode indicar variação na agressividade de *Fusarium* dependendo da espécie testada ou mesmo da estirpe. Como *Fusarium* spp. encontra-se amplamente distribuído no Brasil, é preciso implementar medidas de manejo fitossanitário das sementes de pinus, desde o processo de coleta e, se necessário, desinfestação antes da comercialização ou semeadura.

Em outras espécies de pinus, como *P. halepensis*, Lazreg *et al.* (2014a) identificaram que *Fusarium redolens* e *F. solani* são os principais patógenos causadores de tombamento de mudas dessa espécie e observaram incidência de 91 e 90%, respectivamente, na região de Algeria, na África do Norte. Outra espécie de *Fusarium* identificada como causadora de tombamento de mudas tanto pré como pós-emergência de *P. halepensis*, foi *F. chlamydosporum* (LAZREG *et al.*, 2013).

Várias espécies de *Fusarium* não possuem especificidade de hospedeiro (LAZAROTTO *et al.*, 2012; STEEMKAMP, *et al.*, 2012; LAZREG *et al.*, 2013; LAZREG *et al.*, 2014a; LAZREG *et al.*, 2014b), fato também comprovado no presente trabalho como isolados do complexo *F. fujikuroi* que causaram tombamento de plântulas de *P. taeda*, *P. elliottii* var. *elliottii*, *P. maximinoi*, *P. caribaea* var. *hondurensis* e *P. oocarpa*. Este patógeno ataca uma variada gama de hospedeiros (LAZAROTTO *et al.*, 2012; KAWAKAMI *et al.*, 2015), podendo ser encontrado no ar, em solo, sementes e outros órgãos vegetais (SCWEIGKOFER *et al.*, 2004; KAWAKAMI *et al.*, 2015). A detecção de *Fusarium* sp. e sua transmissão da semente para plântulas também tem sido relatada em outras espécies florestais como angico vermelho (MACIEL *et al.*, 2012) e cedro (LAZAROTTO *et al.*, 2012).

No presente trabalho relata-se a associação patogênica de *Fusarium* spp. em sementes de *Pinus* spp. e os riscos à produção de mudas. É preciso, portanto, uma nova abordagem sobre a produção, coleta, beneficiamento e distribuição de sementes de pinus no Brasil.

4. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho, é possível apresentar as seguintes conclusões:

– *Fusarium* sp. está associado a cinco espécies de pinus, sendo duas de pinus subtropicais (*P. taeda* e *P. elliottii* var. *elliottii*) e três de pinus tropicais (*P. maximinoi*, *P. caribaea* var. *hondurensis* e *P. oocarpa*).

– Foi possível detectar *Fusarium* sp. por meio dos dois métodos utilizados, DS e DP.

–Dentre os 29 isolados de *Fusarium* spp. testados, 14 mostraram ser patogênicos, sendo as espécies *F. graminearum*, *F. oxysporum*, fungos do complexo *F. fujikuroi*, *F. meridionale* e *F. andiyazi* patogênicas para os pinus subtropicais e isolados do complexo *F.fujikuroi*, para pinus tropicais, causando tombamento de plântulas.

5. REFERÊNCIAS

ALONSO, R.; BETTUCCI, L. First report of the pitch canker fungus *Fusarium circinatum* affecting *Pinus taeda* seedlings in Uruguai. **Australasian Plant Disease Notes**, v.4, p.91–92. 2009. <http://link.springer.com/article/10.1071/DN09039>

AUER, C. G.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; SANTOS, A. F. dos **Doenças em pinus: identificação e controle**. Colombo: Embrapa Florestas. Circular técnica 48, p.28. 2001.

BENETTII, S. C.; SANTOS, A. F. dos; MEDEIROS, A. C. S.; JACCOUD FILHO, D. S. Levantamento de fungos em sementes de cedro e avaliação da patogenicidade de *Fusarium* sp. e *Pestalotia* sp. **Pesquisa Florestal Brasileira**, n.58, p.81-85, 2009. www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/577222/1/995PB.pdf.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Mapa. *Instrução Normativa Mapa nº 41*, de 01 de julho de 2008, altera os anexos I e II da Instrução Normativa nº 52, de 20 de novembro de 2007, que estabelece a lista de pragas quarentenárias ausentes (A1) e de pragas quarentenárias presentes (A2) para o Brasil e aprovar os procedimentos para as suas atualizações. http://www.agricultura.gov.br/arg_editor/file/vegetal/dsv/sistemasweb_agricultura_gov_br_sislegis_action_detalhaAt.pdf.

CAPRILLES, C.H.; MATA, S.; MIDDELVEEN, M. Preservation of fungi in water (Castellani): 20 years. **Mycopathologia**. p.73-79, 1989.

GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; PARIS, C.; AUER, C. G. Fusariose em mudas de *Pinus taeda*. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n.52, p.157-162. 2006. pfb.cnpf.embrapa.br/pfb/index.php/pfb/article/download/221/172.

HAIDER, A.; RIAZ, A.; SATTAR, A.; FAROOQ, M. Incidence of chir pine (*Pinus roxburghii*) nursery diseases in Murree hills and their *in vitro* management. **Pakistan Journal of Phytopathology**, v.26, n.2, p.265-269. 2014. <http://pjp.pakps.com/index.php/PJP/article/view/136/77>.

HERRON, D. A.; WINGFIELD, M. J.; WINGFIELD, B. D.; RODAS, C. A.; MARINCOWITZ, S.; STEENKAMP, E. T. Novel taxa in the *Fusarium fujikuroi* species complex from *Pinus* spp. **Studies in Micology**, v.80, p.131-150. 2015. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166061614000530>.

HOCKING, D. Fungi associated with damped-off and healthy pine seedlings and with seed in east African pine nurseries. **Transections British Mycological Society** v.51, n.2, p.221-226. 1968. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0007153668800555>.

HOMECHIN, M; PIZZINATTO, M. A.; MENTEN, J. O. M. Sanidade de sementes de *P. elliottii* var. *elliottii* e *Pinus taeda* e patogenicidade de *Fusarium oxysporum* em plântulas de *P. elliottii* var. *elliottii*. **Summa Phytopatologica**, v.12, p.102-112. 1986.

HUANG, J. W. Fungi associated with damping-off of slash pine seedlings in Georgia. **Plant Disease**, v.74, p.27-30. 1990. http://www.apsnet.org/publications/plantdisease/backissues/Documents/1990Articles/PlantDisease74n01_27.PDF.

IBÁ - Indústria brasileira de árvores. Relatório iba 2016. 2016. <http://iba.org/images/shared/iba_2015.pdf>. Acesso em: 02 de nov. de 2016.

KAWAKAMI, A.; KATO, N.; SASAYA, T.; TOMIOKA, K.; INOUE, H.; MIYASAKI, A.; HIRAYAE, K. Giberella ear rot corn caused by *Fusarium asiaticum* in Japan. **Plant Pathology**, v.81, p. 324-327. 2015. <http://link.springer.com/article/10.1007/s10327-015-0593-z>.

LAZAROTTO, M.; MUNIZ, M. F. B.; BELTRAME, R.; SANTOS, A. F. dos; MACIEL, C. G.; LONGHI, S. J. Sanidade, transmissão via semente e patogenicidade de fungos em sementes de *Cedrella fissilis* procedentes da região sul do Brasil. **Ciência Florestal**, v.22, n.3, p.493-503. 2012. <http://dx.doi.org/10.5902/198050986617>

LAZREG, F.; BELABID, L. SANCHEZ, J.; GALLEGU, E.; GARRIDO-CARDENAS, J. A.; Elhaitoum. First report of *Fusarium chlamydosporum* causing damping – off disease on Aleppo pine in Alegria. **Plant Disease**, v.97, n.11. 2013. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-02-13-0208-PDN>

LAZREG, F.; BELABID, L.; SANCHEZ, J.; GALLEGU, E.; BAYAA, B. Pathogenicity of *Fusarium* spp. associated with diseases of Aleppo – pine seedlings in Algeria forest nurseries. **Journal of Forest Science**, v.60, n.3, p.115-120. 2014a. <http://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/117938.pdf>

LAZREG, F.; BELABID, L.; SANCHEZ, J.; GALLEGOS, E.; GARRIDO-CARDENAS, J. A.; Elhaitoum, A. First report of *Fusarium equiseti* causing damping-off disease on Aleppo pine in Alegria. **Plant Disease**, v.98, n.9, p.1268. 2014b. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-02-13-0194-PDN>

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. The Fusarium Laboratory Manual. 2006.388p.

LORI, G. A.; SALERNO, M. I. *Fusarium* species on seeds of *Pinus taeda* L. and *P. elliottii* var. *elliottii* Engelm. In Argentina. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v.5, p.437-443. 2003. doi:10.1007/BF03356121.

MACIEL, C. G.; MUNIZ, M. F. B.; MILANESI, P. M.; LAZAROTTO, M.; BLUME, E. First report of *Fusarium sambucinum* associated on *P. elliottii* var. *elliottii* seeds in Brazil. **Plant Disease**, v.97, n.7, p.995. 2013. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-11-12-1045-PDN>.

MACIEL, C. G.; MUNIZ, M. F. B.; SANTOS, A. F.; LAZAROTTO, M. Detecção, transmissão e patogenicidade de fungos em sementes de amendoim-vermelho (*Parapiptadenia rigida*). **Summa Phytopathologica**, v.38, n.4, p.323-328. 2012. <http://www.scielo.br/pdf/sp/v38n4/09.pdf>.

PFENNING, H. P.; COSTA, S. S.; MELO, M. P.; COSTA, H.; VENTURA, J. A.; AUER, C. G.; SANTOS, A. F. dos. First report and characterization of *Fusarium circinatum*, the causal agent of pitch canker in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v.39, p.210–216. 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S1982-56762014000300004>.

SANTOS, A. F. dos; PARISI, J. J. D.; MENTEN, J. O. M. Patologia de Sementes Florestais. Colombo: Embrapa Florestas. 2011.

SCWEIGKOFER, W.; O'DONNELL, K.; GARBELOTTO, M. Detection and quantification of airborne conidia of *Fusarium circinatum*, the causal agent of pine pitch canker, from two California sites by using a real-time PCR approach combined with a simple spore trapping method. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.6. 2004. <http://aem.asm.org/content/70/6/3512.abstract>.

SILVA, T. W. R. **Associação de *Fusarium* spp. com sementes de *P. taeda*: detecção, transmissão, patogenicidade e biocontrole**. 2013. 98 f. Dissertação (mestrado em ciências agrárias) – Programa de pós-graduação em agronomia – produção vegetal, setor de ciências agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2013.

STEENKAMP, E. T.; Rodas, C. A.; Wingfield, M. J. *Fusarium circinatum* and pitch canker of *Pinus* in Colombia. **Australasian Plant Pathology**, v.41, p.483–491. 2012. <http://link.springer.com/article/10.1007/s13313-012-0120-z>

WINGFIELD, M. J.; JACOBS, A.; COUTINHO, T. A.; AHUMADA, R.; WINGFIELD, B. D. First report of the pitch canker fungus, *Fusarium circinatum*, on pines in Chile. **Plant Pathology**, p. 397-2002. <http://www.ndrs.org.uk/article.php?id=004016>

Tabela 1.1 - Origem dos isolados de *Fusarium* spp. em cada lote de sementes de pinus, detectados pelos testes de detecção em sementes (DS) e detecção em plântulas (DP)

Lote	Grupo	Espécie	Local de coleta das sementes	Isolados de <i>Fusarium</i>	
				DS	DP
1	Pinus subtropicais	<i>P. taeda</i>	Itapeva/SP	FPT 15	-
2		<i>P. taeda</i>	Sengés/PR	FPT11	-
3		<i>P. taeda</i>	Otacílio Costa/SC	-	FPT 7; FPT 10
4		<i>P. taeda</i>	Telêmaco Borba/PR	FPT 1; FPT 2; FPT 3; FPT 4; FPT 5	-
5		<i>P. taeda</i>	Angatuba/SP	-	FPT 12; FPT 14; FPT 16 ; FPT 17; FPT 18
6		<i>P.taeda</i>	Telêmaco Borba/PR	FPT 6; FPT 8; FPT 9	-
7		<i>P. taeda</i>	Telêmaco Borba/PR	-	-
8		<i>P. taeda</i>	Otacílio Costa/SC	-	-
9		<i>P.taeda</i>	São Cristóvão do Sul/SC	-	FPT 19; FPT 20
10		<i>P. taeda</i>	Colombo/PR	-	-
11		<i>P. taeda</i>	Telêmaco Borba/PR	-	-
12		<i>P. elliotii</i> var. <i>elliotii</i>	Telêmaco Borba/PR	FPE 3; FPE 4	-
13		<i>P. elliotii</i> var. <i>elliotii</i>	Colombo/PR	-	-
14		<i>P. elliotii</i> var. <i>elliotii</i>	Bofete/SP	-	FPE 1; FPE 2; FPE5
15	Pinus tropicais	<i>P. maximinoi</i>	Telêmaco Borba/PR	-	FPM 1; FPM 2
16		<i>P. maximinoi</i>	Ventania/PR	-	-
17		<i>P.maximinoi</i>	Angatuba/SP	-	-
18		<i>P. greggii</i>	Telêmaco Borba/PR	-	-
19		<i>P. oocarpa</i>	Agudos/SP	-	FPO
20		<i>P. tecunumanii</i>	Presidente Castelo Branco/PR	-	-
21		<i>P. patula</i>	Camanducai/SP	-	-
22		<i>P. patula</i>	Vargem Bonita/SC	-	-
23		<i>P. patula</i>	Irani/PR	-	-
24		<i>P. caribaea</i> var. <i>hondurensis</i>	Ventania/PR	-	-
25		<i>P. caribaea</i> var. <i>hondurensis</i>	Morada Nova/MG	-	FPC 1; FPC 2
26		<i>P. caribaea</i> var. <i>hondurensis</i>	Morada Nova/MG	-	-

Tabela 1.2 - Incidência (%) de *Fusarium* spp. em pinus subtropicais (lotes 1 a 14) e tropicais (lotes 15 a 26), pelo método de Detecção em Sementes (DS) e Detecção em Plântulas (DP).

Lote	Hospedeiro	Incidência (%)		Espécies de <i>Fusarium</i>	
		DS	DP	DS	DP
1	<i>Pinus taeda</i>	1	(-)	complexo <i>F. fujikuroi</i>	(-)
2	<i>Pinus taeda</i>	1	(-)	<i>F. verticillioides</i>	(-)
3	<i>Pinus taeda</i>	(-)	2	(-)	<i>Fusarium graminearum</i> e <i>F. oxysporum</i>
4	<i>Pinus taeda</i>	5	(-)	<i>F. incarnatum-equiseti</i> e <i>F. oxysporum</i>	(-)
5	<i>Pinus taeda</i>	(-)	6	(-)	Complexo <i>F. fujikuroi</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F. andyiazi</i> e <i>F. incarnatum-equiseti</i>
6	<i>Pinus taeda</i>	3	(-)	<i>F. oxysporum</i> e <i>F. proliferatum</i>	(-)
7	<i>Pinus taeda</i>	(-)	(-)	(-)	(-)
8	<i>Pinus taeda</i>	(-)	(-)	(-)	(-)
9	<i>Pinus taeda</i>	2	(-)	(-)	<i>F. andyiazi</i> e <i>F. meridionale</i>
10	<i>Pinus taeda</i>	(-)	(-)	(-)	(-)
11	<i>Pinus taeda</i>	(-)	(-)	(-)	(-)
12	<i>P. elliotii</i> var. <i>elliotii</i>	2	(-)	complexo <i>F. fujikuroi</i>	(-)
13	<i>P. elliotii</i> var. <i>elliotii</i>	(-)	(-)	(-)	(-)
14	<i>P. elliotii</i> var. <i>elliotii</i>	(-)	3	(-)	<i>Fusarium</i> sp. <i>F. oxysporum</i> e <i>F. meridionale</i>
15	<i>Pinus maximinoi</i>	(-)	2	(-)	complexo <i>F. fujikuroi</i>
16	<i>Pinus maximinoi</i>	(-)	(-)	(-)	(-)
17	<i>Pinus maximinoi</i>	(-)	(-)	(-)	(-)
18	<i>Pinus greggii</i>	(-)	(-)	(-)	(-)
19	<i>Pinus oocarpa</i>	(-)	1	(-)	complexo <i>F. fujikuroi</i>
20	<i>Pinus tecunumannii</i>	(-)	(-)	(-)	(-)
21	<i>Pinus patula</i>	(-)	(-)	(-)	(-)
22	<i>Pinus patula</i>	(-)	(-)	(-)	(-)
23	<i>Pinus patula</i>	(-)	(-)	(-)	(-)
24	<i>P. caribaea</i> var. <i>hondurensis</i>	(-)	(-)	(-)	(-)
25	<i>P. caribaea</i> var. <i>hondurensis</i>	(-)	2	(-)	<i>F. oxysporum</i> e <i>Fusarium</i> sp.
26	<i>P. caribaea</i> var. <i>hondurensis</i>	(-)	(-)	(-)	(-)

(-) Não encontrado.

Tabela 1.3 - Emergência (%) e tombamento (%) de plântulas de pinus subtropicais (*Pinus taeda*, *P. elliottii* var. *elliottii*) e tropicais (*P. maximinoi*, *P. caribaea* var. *hondurensis* e *P. oocarpa*), com inoculação prévia de *Fusarium* spp. nas sementes, aos 28 dias após a semeadura.

<i>Pinus taeda</i>			
Isolado	Espécie	Emergência (%)	Tombamento (%)
FPT1	<i>Fusarium incarnatum-equiseti</i>	6 bcd	0 c
FPT2	<i>Fusarium incarnatum-equiseti</i>	10 abcd	0 c
FPT3	<i>Fusarium oxysporum</i>	8 bcd	0 c
FPT4	<i>Fusarium oxysporum</i>	4 cd	0 c
FPT5	<i>Fusarium oxysporum</i>	12 abcd	0 c
FPT6	<i>Fusarium oxysporum</i>	4 cd	0 c
FPT7	<i>Fusarium graminearum</i>	12 abcd	2 bc
FPT8	<i>Fusarium oxysporum</i>	2 d	0 c
FPT9	<i>Fusarium proliferatum</i>	2 d	0 c
FPT10	<i>Fusarium oxysporum</i>	14 abcd	0 c
FPT11	<i>Fusarium verticillioides</i>	10 abcd	0 c
FPT12	Complexo <i>F. fujikuroi</i>	2 d	2 bc
FPT14	Complexo <i>F. fujikuroi</i>	16 abcd	8 bc
FPT15	Complexo <i>F. fujikuroi</i>	22 abc	10 abc
FPT16	<i>Fusarium andiyazi</i>	28 a	14 ab
FPT17	<i>Fusarium incarnatum-equiseti</i>	6 bcd	0 c
FPT18	<i>Fusarium</i> sp.	12 abcd	0 c
FPT19	<i>Fusarium andiyazi</i>	2 d	0 c
FPT20	<i>Fusarium meridionale</i>	24 ab	22 a
	Testemunha	10 abcd	0 c
<i>P. elliottii</i> var. <i>elliottii</i>			
Isolados		Emergência (%)	Tombamento (%)
FPE1	<i>Fusarium oxysporum</i>	28	25
FPE2	<i>Fusarium</i> sp.	8	25
FPE3	Complexo <i>F. fujikuroi</i>	12	40
FPE4	Complexo <i>F. fujikuroi</i>	22	27,8
FPE5	<i>Fusarium meridionale</i>	28	20
	Testemunha	36	0
<i>Pinus maximinoi</i>			
Isolados		Emergência (%)	Tombamento (%)
FPM1	Complexo <i>F. fujikuroi</i>	84	2,4 b
FPM2	Complexo <i>F. fujikuroi</i>	84	25 a
	Testemunha	80	0 b
<i>P. caribaea</i> var. <i>hondurensis</i> var. <i>hondurensis</i>			
Isolados		Emergência (%)	Tombamento (%)
FPC1	<i>Fusarium oxysporum</i>	0 b	0
FPC2	<i>Fusarium</i> sp.	0 b	0
	Testemunha	6 a	0
<i>Pinus oocarpa</i>			
Isolados		Emergência (%)	Tombamento (%)
FPO	Complexo <i>F. fujikuroi</i>	38	42
	Testemunha	66	0

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 1.4 - Caracterização patogênica de *Fusarium* spp. detectados em sementes (DS) ou em plântulas (DP), causadoras de tombamento de plântulas em *Pinus* spp.

Espécie de <i>Fusarium</i>	Espécie de <i>Pinus</i> que foi detectado		Patogênico
	DS	DP	
<i>F. graminearum</i>	nd	<i>P. taeda</i>	sim
<i>F. meridionale</i>	nd	<i>P. taeda</i> e <i>P. elliotii</i> var. <i>elliottii</i>	sim
<i>F. andyiazi</i>	nd	<i>P. taeda</i>	sim
<i>F. incarnatum-equiseti</i>	<i>P. taeda</i>	<i>P. taeda</i>	não
<i>F. oxysporum</i>	<i>P. taeda</i>	<i>P. taeda</i> , <i>P. elliotii</i> var. <i>elliottii</i> e <i>P. caribaea</i> var. <i>hondurensis</i>	sim
<i>F. proliferatum</i>	<i>P. taeda</i>	nd	não
Complexo <i>F. fujikuroi</i>	<i>P. taeda</i> e <i>P. elliotii</i> var. <i>elliottii</i>	<i>P. taeda</i> , <i>P. elliotii</i> var. <i>elliottii</i> , <i>P. maximinoi</i> e <i>P. caribaea</i> var. <i>hondurensis</i>	sim
<i>F. verticillioides</i>	<i>P. taeda</i>	nd	não

nd – não detectado

Capítulo 2 - CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E MORFOLÓGICA DE ISOLADOS DE *Fusarium* spp. PROVENIENTES DE SEMENTES DE PÍNUS NO BRASIL

RESUMO: Na cultura do pínus *Fusarium* spp. têm causado perdas em viveiros e plantios e faltam informações a respeito do fungo associado a essa cultura. O objetivo do presente trabalho foi identificar e caracterizar isolados de *Fusarium* spp. presentes em sementes de pínus oriundas de regiões produtoras de Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Minas Gerais, por meio de caracteres moleculares e morfológicos. A primeira caracterização baseou-se na análise das regiões do fator de elongação 1-alfa e na segunda maior subunidade da RNA polimerase (RPB2). Além disso, realizou-se análise filogenética dos isolados. Para a caracterização morfológica, os isolados foram crescidos em meio batata-dextrose-agar (BDA) para avaliação cultural e em meio folha de cravo agar (FCA) para análises morfológicas. Os isolados de *Fusarium* foram agrupados em quatro complexos de espécies: complexo *Fusarium fujikuroi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium incarnatum* e *Fusarium graminearum*, o que foi confirmado com a caracterização morfológica. Por meio de análise filogenética, os isolados pertencentes ao complexo *Fusarium fujikuroi* apresentaram variabilidade entre si, sendo difícil a diferenciação entre isolados do mesmo grupo por meio de caracteres morfológicos.

Palavras-chave: PCR, identificação de espécies.

Chapter 2 - MOLECULAR AND MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF ISOLATES OF *Fusarium* spp. FROM PINE SEEDS IN BRAZIL

ABSTRACT: In the culture of pine, *Fusarium* spp. has caused losses in nurseries and plantations and lack information on the associated *Fusarium* species. The objective of the present work was to identify and characterize isolates of *Fusarium* spp. present in pine seeds from producing regions of Santa Catarina, Paraná, São Paulo and Minas Gerais, using molecular and morphological characters. The first characterization was based on the analysis of the regions elongation factor 1-alpha and on the second largest subunit of RNA polymerase (RPB2). In addition, a phylogenetic analysis of the isolates was carried out. For the morphological characterization, the isolates were grown in potato-dextrose-agar (PDA) environment for the cultural evaluation and carnation leaf agar (CLA) environment for the morphological analysis. *Fusarium* isolates were grouped into four species complexes: *Fusarium fujikuroi* species complex, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium incarnatum* and *Fusarium graminearum* which was confirmed with morphological characterization. Using phylogenetic analysis, the isolates belonging to the *Fusarium fujikuroi* complex showed variability among themselves, making the differentiation among isolates of the same group difficult, using morphological characters.

Keywords: PCR, species identification.

1. INTRODUÇÃO

A área plantada de pinus (*Pinus* spp.) no Brasil é de aproximadamente 1,6 milhões de ha, alcançando uma produtividade de 31 m³/ha.ano. Os principais estados brasileiros produtores de pinus estão localizados nas regiões Sul (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul) e Sudeste (São Paulo e Minas Gerais), sendo o Paraná o principal produtor com 0,7 milhão de ha (IBÁ, 2016).

Dentre os fitopatógenos que atacam a cultura do pinus, *Fusarium* spp. têm se destacado, acarretando perdas desde viveiros até plantios adultos, em diversas regiões do mundo (DICK & DOBBIE, 2002; CARLUCCI *et al.*, 2007; PÉREZ-SIERRA *et al.*, 2007; PFENNING *et al.*, 2014; STEWARK *et al.*, 2016). Em viveiros, as doenças causadas por *Fusarium* spp. são caracterizadas por podridão radicular e tombamento de plântulas. As espécies *F. oxysporum*, *F. equiseti* e *F. verticillioides* já foram relatadas causando tais sintomas em plântulas de *Pinus ponderosa* (SALERNO & LORI, 2007) e *F. circinatum* em viveiros de *Pinus maximinoi*, *Pinus tecunumani* e *Pinus patula* (STEENKAMP *et al.*, 2012). No Brasil, há poucos registros sobre a associação patogênica de *Fusarium* spp. às sementes de pinus havendo apenas registros realizados por Homechin *et al.* (1986) para *F. oxysporum* em *P. elliottii* var. *elliottii*, e por Maciel *et al.* (2013) para *F. sambucinum* na mesma espécie.

A caracterização de espécies de *Fusarium* é uma tarefa complexa, uma vez que somente as características morfológicas podem levar à identificação errônea quando utilizadas como único critério. De acordo com Ventura (2000), a identificação com base na taxonomia tradicional deve ser detalhista, mas se torna subjetiva, devido à variabilidade das características fenotípicas. Para contornar esse problema, ferramentas moleculares têm sido empregadas (KURAMAE & SOUZA, 2008; DARIVA *et al.*, 2015), permitindo minimizar os erros na identificação de espécies. Dentre as técnicas mais utilizadas, a reação em cadeia da polimerase (PCR) permite a identificação rápida e acurada, quando comparado com a identificação morfológica (WALCOTT, 2003). Enquanto a identificação morfológica leva, no mínimo, dez dias para realizar as avaliações, a identificação molecular pode ser realizada em até 48 horas (WALKER *et al.*, 2016).

Na identificação de *Fusarium* spp. as regiões do fator de alongação 1- alfa (EF - 1 α) e a segunda maior subunidade da RNA polimerase (RPB2) têm sido as

mais utilizadas por serem regiões conservadas e sensíveis na diferenciação interespecífica (GEISER *et al.*, 2004; REHNER *et al.*, 2011).

Diante da falta de informações sobre *Fusarium* em pinus no Brasil, este trabalho teve por objetivo identificar e caracterizar isolados de *Fusarium* de sementes de pinus oriundas das principais regiões produtoras, por meio de análises moleculares e morfológicas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 29 isolados de *Fusarium* spp. provenientes de sementes de pinus das regiões produtoras de Santa Catarina (isolados FPT7, FPT10, FPT19 e FPT20), Paraná (isolados FPT1, FPT2, FPT3, FPT4, FPT5, FPT6, FPT8, FPT9, FPT11, FPE3, FPE4, FPM1 e FPM2), São Paulo (isolados FPT12, FPT14, FPT15, FPT16, FPT17, FPT18, FPE1, FPE2, FPE5 e FPO) e Minas Gerais (isolados FPC1 e FPC2). Os isolados de *Fusarium* spp. encontravam-se na coleção de Fungos Florestais da Embrapa Florestas, Colombo-PR, armazenados pelo método Castellani. Em estudos prévios foi demonstrada a patogenicidade destes isolados em mudas de pinus (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 - Patogenicidade de isolados de *Fusarium* detectados em sementes de pinus no Brasil.

Isolado	Estado do Brasil	Espécie testada	Patogênico
FPT1	PR	<i>P. taeda</i>	-
FPT2	PR	<i>P. taeda</i>	-
FPT3	PR	<i>P. taeda</i>	-
FPT4	PR	<i>P. taeda</i>	-
FPT5	PR	<i>P. taeda</i>	-
FPT6	PR	<i>P. taeda</i>	+
FPT7	SC	<i>P. taeda</i>	-
FPT8	PR	<i>P. taeda</i>	-
FPT9	PR	<i>P. taeda</i>	-
FPT10	SC	<i>P. taeda</i>	-
FPT11	PR	<i>P. taeda</i>	-
FPT12	SP	<i>P. taeda</i>	+
FPT14	SP	<i>P. taeda</i>	+
FPT15	SP	<i>P. taeda</i>	+
FPT16	SP	<i>P. taeda</i>	+
FPT17	SP	<i>P. taeda</i>	-
FPT18	SP	<i>P. taeda</i>	-
FPT19	SC	<i>P. taeda</i>	-
FPT20	SC	<i>P. taeda</i>	+
FPE1	SP	<i>P. elliottii</i> var. <i>elliottii</i>	+
FPE2	SP	<i>P. elliottii</i> var. <i>elliottii</i>	+
FPE3	PR	<i>P. elliottii</i> var. <i>elliottii</i>	+
FPE4	PR	<i>P. elliottii</i> var. <i>elliottii</i>	+
FPE5	SP	<i>P. elliottii</i> var. <i>elliottii</i>	+
FPM1	PR	<i>P. maximinoi</i>	+
FPM2	PR	<i>P. maximinoi</i>	+
FPC1	MG	<i>P. caribaea</i> var. <i>hondurensis</i>	+
FPC2	MG	<i>P. caribaea</i> var. <i>hondurensis</i>	+
FPO	SP	<i>P. oocarpa</i>	+

2.1 Caracterização molecular

Para caracterização molecular, o DNA foi extraído do micélio utilizando-se o kit Wizard® Genomic DNA Purification da Promega. As culturas foram crescidas em meio BDA e o micélio foi raspado com um bisturi esterilizado e pesado 0,4 g. Após a extração, a qualidade do DNA foi avaliada em gel de agarose 0,8% (v/v).

As amostras de DNA genômico foram submetidas à PCR para amplificação da região do fator de alongação 1-alfa (EF-1 α), sendo utilizados os *primers* TEF1 (5' ATGGGTAAGGARGACAAGAC 3') e TEF2 (5' GGARGTACCAGTSATCATGTT 3'), e amplificação da segunda maior subunidade da RNA polimerase II (RPB2) cujos *primers* foram 7cf (5' ATGGGYAARCAAGCYATGGG 3') e 11ar (5' GCRTGGATCTTRTCRTCSACC 3'). A reação de PCR, para ambas regiões, foi preparada para um volume final de 25 μ L, contendo aproximadamente 30ng de

DNA, tampão 1x, 2,5 µM de dNTP, 3 mM de MgCl₂, 10 µM de cada *primer* e 0,2 unidades da enzima Taq polimerase. Para a região TEF, a amplificação foi realizada em termociclador sob as seguintes condições: 94 °C por 1 min; 34 ciclos de 94 °C por 30 s, 62 °C por 45 s e 72 °C por 1 min; extensão final de 72 °C por 5 min. Para a região RPB2 as condições foram: 96°C por 5 min; 30 ciclos de 94 °C por 30 s, 52 °C por 30 s e 72 °C por 1 min; extensão final de 72 °C por 8 min. A amplificação da região EF-1α gerou fragmentos de aproximadamente 500pb e a região RPB2 gerou fragmentos de aproximadamente 700 pares de bases (pb).

Os produtos da PCR foram purificados com acetato de amônio e foram sequenciados em sequenciador Mega BACE 500 (Amersham). As sequências obtidas foram editadas com o auxílio do pacote do programa Staden versão 1.6 (BONFIELD et al. 2006) e alinhadas pelo programa MEGA versão 4.0 (TAMURA et al. 2006). As sequências foram comparadas com outras sequências existentes no banco de dados Fusarium - ID pelo programa BLAST, permitindo a detecção de similaridade com sequências caracterizadas já depositadas.

2.2 Análise filogenética

Para a análise filogenética, as sequências “consensu” foram comparadas com a base de dados GenBank, do National Center for Biotechnological Information – NCBI, por meio do programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/>). Nas análises filogenéticas, sequências de referência de espécies de *Fusarium* correspondentes às regiões EF-1α e RPB2, previamente depositadas no GenBank, foram acrescentadas. Alinhamentos múltiplos das sequências de nucleotídeos foram gerados utilizando-se a ferramenta CLUSTALW (THOMPSON et al., 1994), implementado pelo programa MEGA 5 e foram corrigidos manualmente. A análise filogenética foi realizada pelo método de máxima parcimônia (maximum parsimony - MP) por meio do programa MEGA 5 (TAMURA et al., 2011).

Na análise filogenética de EF-1α foram utilizadas 20 sequências consensu e na análise de RPB2 foram utilizadas 18 sequências consenso, pois as demais sequências foram consideradas curtas.

2.3 Caracterização morfológica

Para a caracterização morfológica, foi realizada cultura monospórica de cada isolado, que consistiu na repicagem de apenas um esporo para placas de Petri contendo meio agar-água (2%) (v/v). Por meio da visualização em microscópio óptico da germinação do esporo, o local foi demarcado e repicado para outra placa de Petri contendo meio batata-dextrose-agar (BDA). A placa foi incubada a 24 °C por sete dias para crescimento da cultura. A cultura pura foi cultivada em meio de folha-de-cravo-agar (FCA) (meio de cultura agar – água (20% v/v) com fragmentos de aproximadamente 1cm² de folha de cravo esterilizadas (Ventura, 2000). As placas foram mantidas em câmara do tipo BOD a 24 °C com fotoperíodo de 12 h, por 14 dias. As características avaliadas foram: ausência ou presença de clamidósporos, tipo de célula conidiogênica (monifiálide ou polifiálide), tipo de célula reprodutiva (macro conídios e micro conídios), dimensão das estruturas reprodutivas, disposição dos micro conídios sobre a célula conidiogênica (em cadeia ou “falsas cabeças”) e ausência ou presença de esporodóquio.

Foram confeccionadas lâminas de cada isolado para visualização em microscópio óptico e medidas 50 estruturas de cada tipo de conídio em microscópio Zeiss Axio Lab. A1 objetiva 40x. Os isolados também foram cultivados em meio BDA para análise cultural. Para tanto, as placas foram incubadas a 24 °C no escuro por 72 h e medidos os diâmetros radiais das culturas e, após 14 dias, foi avaliada a coloração das culturas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A identificação das espécies de *Fusarium* foi confirmada com a análise molecular de duas regiões diferentes do material genético; fator de alongação 1 – alfa (EF-1 α) e a segunda maior subunidade da RNA polimerase (RPB2) (Tabela 2.2). Com relação aos isolados FPT16, FPT19 e FPT20, a diferenciação das espécies foi possível pela região que gerou maior valor de identidade. Portanto, FPT16 foi identificado como *F. andiyazi*, que está inserido no complexo *F. fujikuroi*; o isolado FPT19 que, além do maior valor de identidade ser com a espécie *F. andiyazi*, a confirmação também foi realizada pela caracterização morfológica e, o isolado FPT20 identificado como *F. meridionale*.

Tabela 2.2 - Identificação de espécies de *Fusarium* por meio da região fator de alongação 1 – alfa (EF-1 α) e a segunda maior subunidade da RNA polimerase (RPB2), utilizando-se o banco de dados Fusarium-ID.

Isolados	EF - 1 α		RPB2	
	Espécie	ID (%)	Espécie/ complexo de espécies	ID (%)
FPT1	Complexo <i>F. incarnatum-equiseti</i>	93,25	Complexo <i>F. incarnatum-equiseti</i>	98,34
FPT2	Complexo <i>F. incarnatum-equiseti</i>	96,77	Complexo <i>F. incarnatum-equiseti</i>	98,36
FPT3	<i>F. oxysporum</i>	100	<i>F. oxysporum</i>	99,42
FPT4	<i>F. oxysporum</i>	98,16	<i>F. oxysporum</i>	97,86
FPT5	<i>F. oxysporum</i>	99,69	<i>F. oxysporum</i>	99,84
FPT6	<i>F. oxysporum</i>	99,81	<i>F. oxysporum</i>	99,1
FPT7	<i>F. graminearum</i>	96,3	-	-
FPT8	<i>F. oxysporum</i>	100	<i>F. oxysporum</i>	99,74
FPT9	<i>F. proliferatum</i>	99,26	Complexo <i>F. fujikuroi</i>	97,55
FPT10	Complexo <i>F. fujikuroi</i>	97,06	Complexo <i>F. fujikuroi</i>	94,94
FPT11	<i>F. verticillioides</i>	99,39	<i>F. verticillioides</i>	99,35
FPT12	Complexo <i>F. fujikuroi</i>	95,2	Complexo <i>F. fujikuroi</i>	96,6
FPT14	Complexo <i>F. fujikuroi</i>	97,06	Complexo <i>F. fujikuroi</i>	96,5
FPT15	Complexo <i>F. fujikuroi</i>	97,64	-	-
FPT16	<i>F. andiyazi</i>	97,28	Complexo <i>F. fujikuroi</i>	96,67
FPT17	Complexo <i>F. incarnatum-equiseti</i>	98,23	Complexo <i>F. incarnatum-equiseti</i>	99,28
FPT18	-	-	-	-
FPT19	<i>F. andiyazi</i>	97,28	<i>F. verticillioides</i>	96,79
FPT20	<i>F. meridionale</i>	99,65	<i>F. graminearum</i>	98,01
FPE1	<i>F. oxysporum</i>	100	<i>F. oxysporum</i>	99,73
FPE2	-	-	Complexo <i>F. incarnatum-equiseti</i>	98,44
FPE3	Complexo <i>F. fujikuroi</i>	99,84	-	-
FPE4	Complexo <i>F. fujikuroi</i>	99,68	Complexo <i>F. fujikuroi</i>	99,35
FPE5	<i>F. meridionale</i>	99,77	<i>F. graminearum</i>	99,52
FPM1	Complexo <i>F. fujikuroi</i>	99,84	Complexo <i>F. fujikuroi</i>	99,22
FPM2	Complexo <i>F. fujikuroi</i>	98,84	-	-
FPC1	<i>F. oxysporum</i>	99,54	<i>F. oxysporum</i>	99,41
FPC2	<i>Fusarium</i> sp.	93,38	-	-
FPO	Complexo <i>F. fujikuroi</i>	97,21	-	-

(-) não identificado

O gene que codifica a região fator de elongação 1-alfa tem sido o mais utilizado na identificação de *Fusarium* sp. pelo fato de ser um gene de cópia única e informativo a ponto de separar espécies relacionadas (GEISER *et al.*, 2004). A região RPB2, a qual é uma região intergênica nuclear, também tem demonstrado ser eficiente na identificação de espécies de *Fusarium* (REHNER *et al.*, 2011). Conforme o presente trabalho, com o uso dessas duas regiões, foram identificadas as espécies *F. verticillioides*, *F. meridionale*, *F. andiyazi*, *F. graminearum*, *F. proliferatum* e isolados pertencentes ao complexo *F. fujikuroi*, complexo *F. oxysporum* e *F. incarnatum – equiseti*.

Com o alinhamento das sequências obtidas com aquelas já depositadas no Fusarium-ID, pode-se verificar que os isolados avaliados pertencem a quatro diferentes complexos de espécies, sendo que dos 29 isolados obtidos, 13 corresponderam ao complexo *Fusarium fujikuroi* (FFSC), três ao complexo *F. graminearum* (FGSC), sete ao complexo *F. oxysporum* (FOSC) e três ao complexo *F. incarnatum-F. equiseti* (FIESC), e apenas três não tiveram a espécie identificada (Tab 2).

As espécies *F. andiyazi*, *F. proliferatum*, do complexo *F. graminearum* e do complexo *F. incarnatum*, são comuns em culturas agrícolas como arroz, milho, azevém e soja (DAL PRÀ *et al.* 2010; QUESADA-OCAMPO *et al.*, 2016; MACHADO *et al.*, 2015, CHANG *et al.*, 2015, GAI *et al.*, 2016). Com isso, observa-se que espécies de *Fusarium* patogênicas na agricultura podem estar fazendo do pínus um hospedeiro alternativo e sendo patogênicas em áreas florestais. Tal fato pode ser também um meio alternativo de sobrevivência de fungos do gênero *Fusarium*.

A partir das informações moleculares, foram geradas árvores filogenéticas para cada região gênica (Figuras 2.1 e 2.2). O alinhamento de sequências parciais do gene EF-1 α continha 629 caracteres (pares de bases), sendo 327 conservados, 280 variáveis e 207 informativos. A árvore filogenética gerada revelou que os isolados agruparam com aqueles de referência de espécies já descritas: *F. graminearum* do FGSC, *Fusarium incarnatum* do FIESC, *F. oxysporum* linhagem 27 do FOSC, *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. fujikuroi* do FFSC (Figura 2.1), além de um grupo monofilético formado pelos isolados FPT10, FPT12, FPT14, FPT15, FPT16, FPT19 e FPO que não contém sequências de isolados de referência do FFSC, o que provavelmente representa uma nova espécie dentro deste complexo. A possibilidade de ser uma nova espécie é suportado pelo elevado valor de bootstrap

(98%) entre os isolados e distanciamento dos demais isolados do complexo (Figura 2.1), que segundo Schroers *et al.* (2009), valores de bootstrap acima de 90% são considerados relevantes para determinação de uma espécie. Entretanto, para determinação de nova espécie somente a análise filogenética e morfológica não são suficientes para respaldar esse resultado. Outros testes de caracterização são necessários.

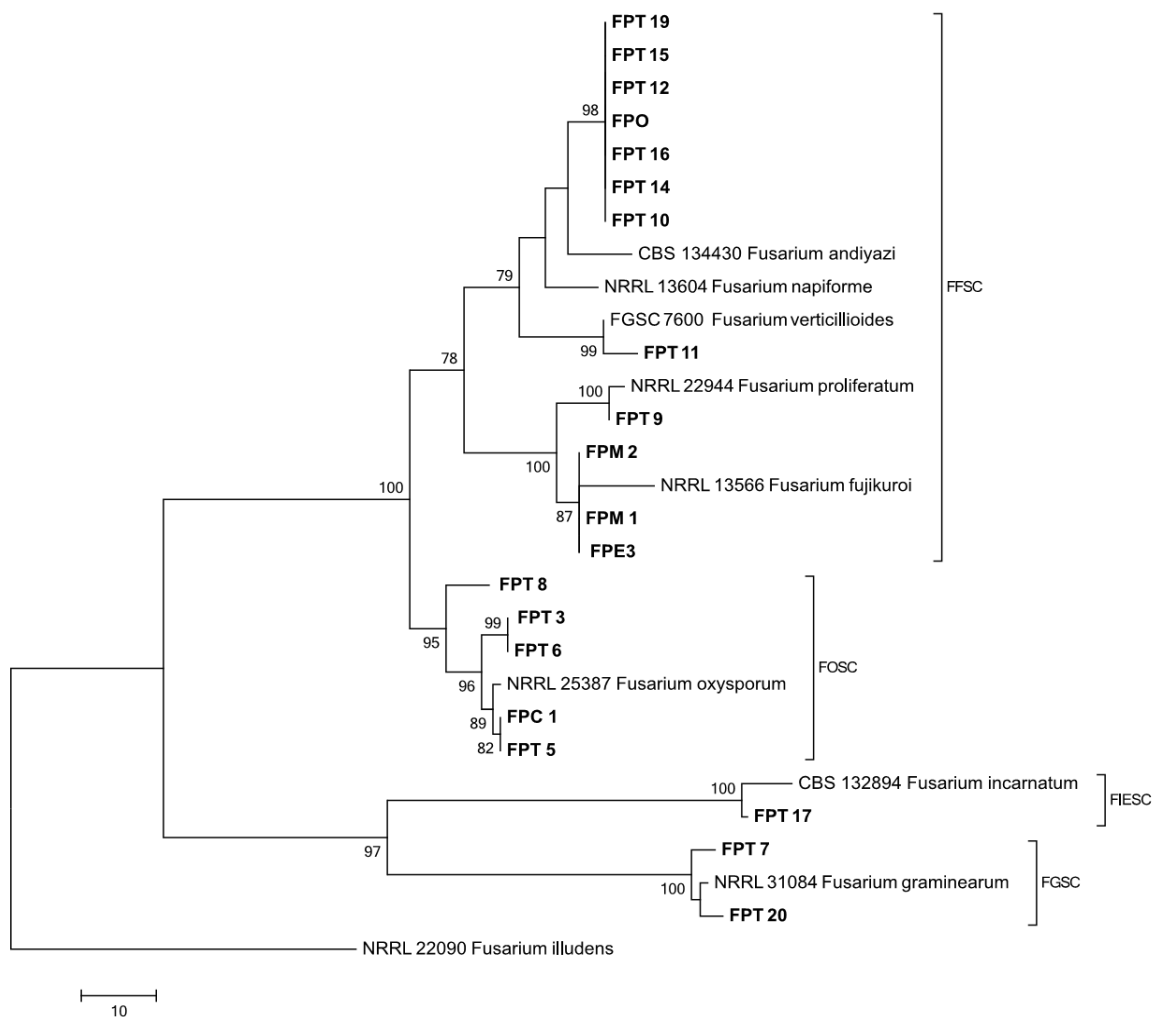


Figura 2.1 - Árvore de máxima parcimônia de espécies de *Fusarium* baseada em sequências parciais do gene EF-1 α . O comprimento dos ramos é indicado por escala na base da árvore, e os valores de bootstrap (1000 repetições) são indicados em porcentagem acima dos internódios. Esta árvore tem como raiz *F. illudens*. CI = 0.78; RI = 0.89

O alinhamento de sequências parciais do gene *RPB2* continha 636 caracteres (pares de bases), sendo 476 conservados, 160 variáveis e destes 110 informativos.

Na análise filogenética de *RPB2* os isolados avaliados também agruparam com os isolados de referência de espécies já descritas: *F. graminearum* do FGSC, *Fusarium incarnatum* do FIESC, *F. oxysporum* linhagem 27 do FOOSC, *F. proliferatum*, *F. fujikuroi* do FFSC e dentro deste último complexo foi verificado um clado formado pelos isolados FPT12, FPT14, FPT16 e FPT19 (Figura 2.2).

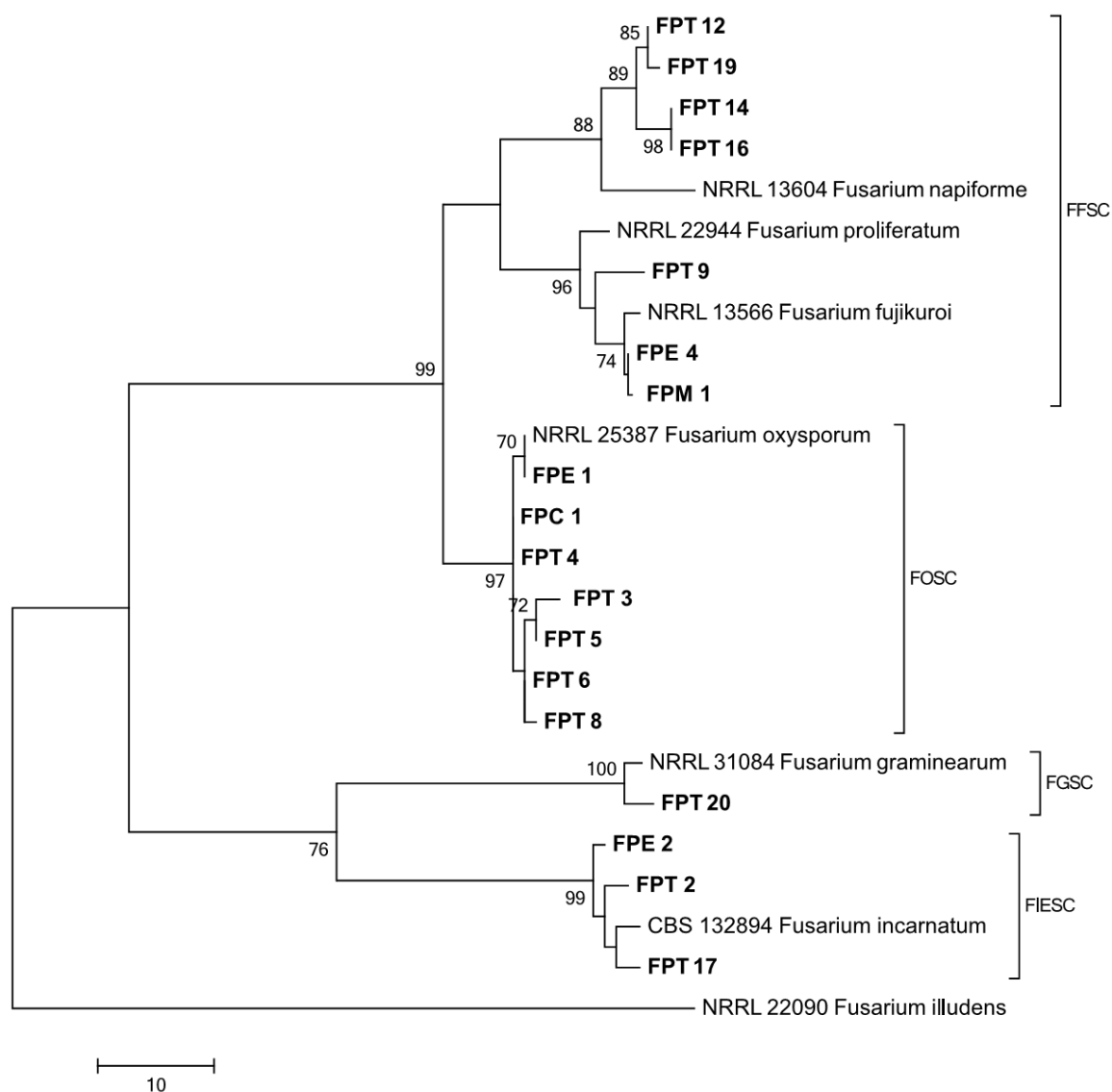


Figura 2.2 - Árvore de Máxima parcimônia de espécies de *Fusarium* baseada em sequências parciais do gene *RPB2*. O comprimento dos ramos é indicado por escala na base da árvore, e os valores de bootstrap (1000 repetições) são indicados em porcentagem acima dos internódios. Esta árvore tem como raiz *F. illudens*. CI = 0.75; RI = 0.87.

Na Figura 2.2, a árvore filogenética revelou que os isolados FPT12, FPT14, FPT16 e FPT19, identificados como pertencentes ao complexo *F. fujikuroi*, são

diferentes entre si. Entretanto, são necessários estudos mais aprofundados para a diferenciação e identificação específica dos mesmos, havendo a possibilidade de descrição de novas espécies.

Por meio da caracterização morfológica, os isolados utilizados no presente trabalho apresentaram variação tanto na coloração do meio de cultura, (branco, laranja pálido, rosa, violeta a vermelho carmim) (Figura 2.3) como na forma e tamanho de conídios (Tabela 2.3 e Figura 2.4), sendo difícil sua identificação específica. Todos os isolados apresentaram crescimento rápido e o micélio aéreo variou de escasso a abundante. Pelas características morfológicas, os 29 isolados de *Fusarium* foram agrupados em espécies dos complexos *F. fujikuroi*, *F. oxysporum*, *F. incarnatum-equiseti* e *F. graminearum*. Ao se observar a coloração do meio de cultura e do micélio, variou para os diferentes isolados do complexo *F. oxysporum*, desde branco, creme a violeta (Figura 2.3). Peres *et al.* (2003) observaram que diferentes isolados de *F. solani*, quando cultivados em diferentes meio de cultura, também apresentaram variação na coloração e no tipo de micélio. Além dos isolados do complexo *F. oxysporum*, outras espécies de *Fusarium* spp., no presente trabalho, também apresentaram colorações creme e branco, não sendo portanto, uma característica exclusiva de determinada espécie. Isso pode ser verificado na Figura 2.3 onde se observa que isolados identificados como *F. incarnatum – equiseti*, *F. verticillioides*, *F. andiyazi*, *F. graminearum* e isolados do complexo *F. fujikuroi* apresentaram a coloração creme. Já a coloração vermelha carmim, que foi observada em cultura de *F. meridionale* no presente trabalho, também foi relatada em *F. acuminatum* por Walker *et al.* (2016). Mesmo não sendo características exclusivas de determinada espécie, os resultados coincidiram com os já descritos na literatura (LESLIE & SUMMERELL, 2006).

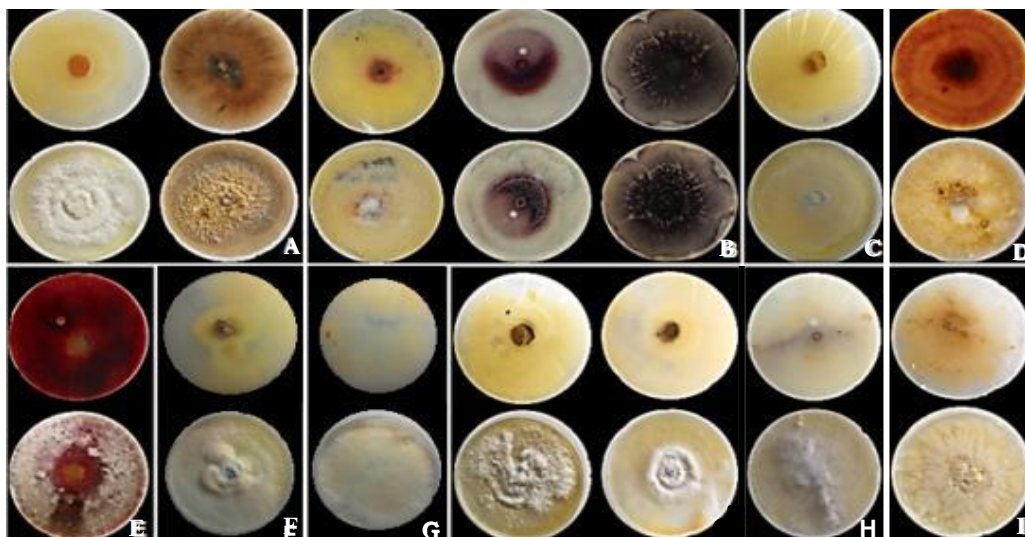


Figura 2.3 - Característica cultural de isolados de *Fusarium* spp. provenientes de sementes de *Pinus* spp. cultivados em meio BDA. A: *F. incarnatum* – *equiseti*; B: *F. oxysporum*; C: *F. andiyazi*; D: *F. graminearum*; E: *F. meridionale*; F: *F. proliferatum*; G: *F. verticillioides*; H: complexo *F. fujikuroi*; I: *Fusarium* sp.

A variação morfológica e a dificuldade em identificar espécies de *Fusarium* é ainda maior quando se faz a avaliação da forma e dimensões de micro e macro – conídios que são similares entre espécies e, ao mesmo tempo, diferentes isolados da mesma espécie são diferentes. e clamidósporos (Figura 2.4 e 2.5).

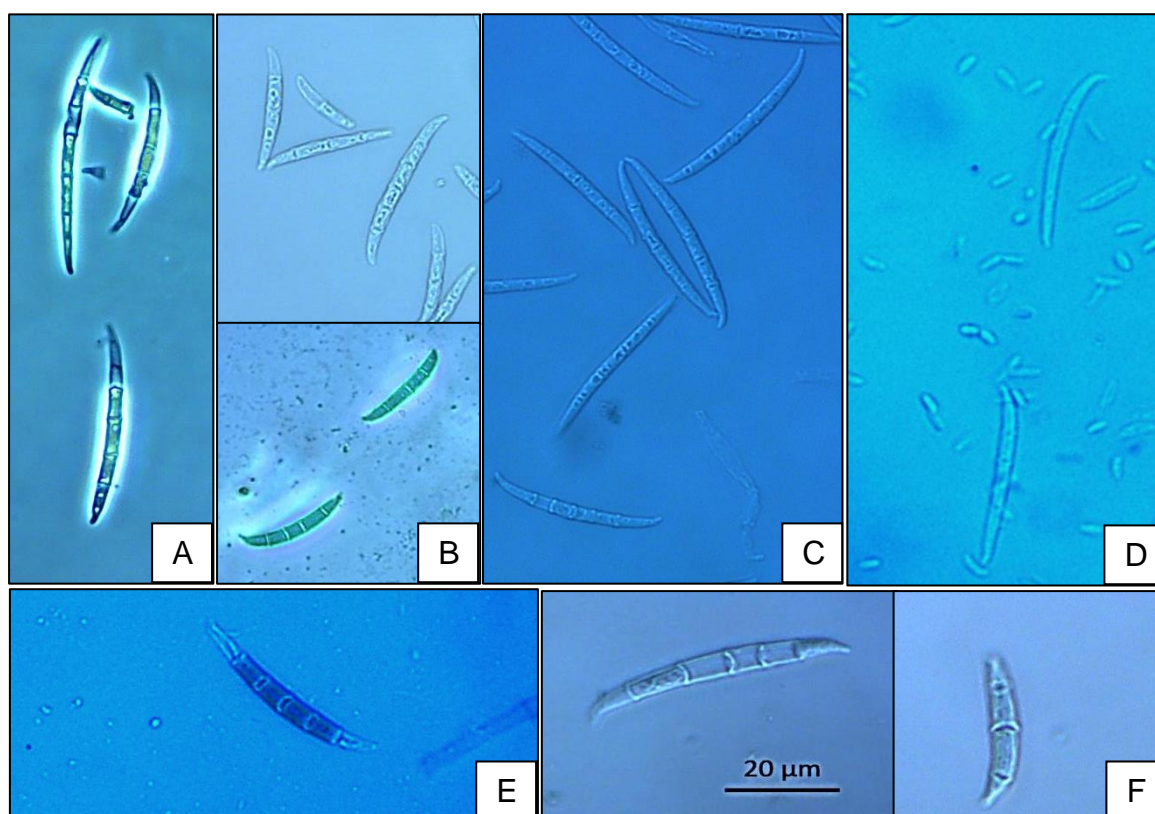


Figura 2.4 - Características morfológicas de macro conídios de *Fusarium* spp. em meio CLA. A: *Fusarium incarnatum* – *equiseti*. B: *F. oxysporum*; C: *F. fujikuroi*; D: *F. andiyazi*. E *F. meridionale*. F: *F. graminearum*.

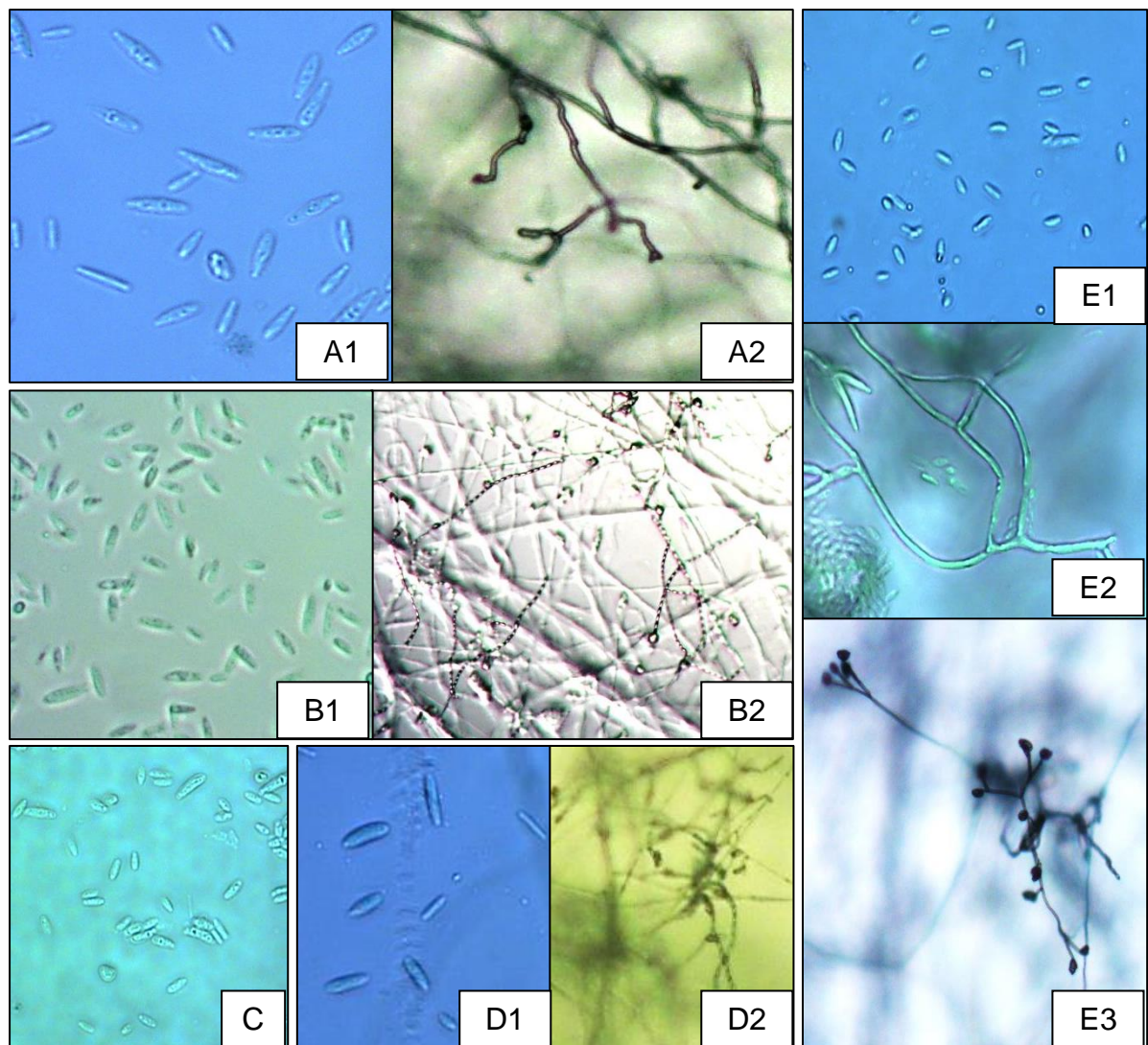


Figura 2.5 - Características morfológicas de microconídios de *Fusarium* spp. em meio CLA. A: *Fusarium fujikuroi* A1 – Microconídios. A2 – polifiálide; B: *F. verticillioides*. B1 – microconídios; B2 – formação de microconídios em cadeias longas C: microconídios de *F. oxysporum*. D: *F. proliferatum*. D1 – microconídios, D2 – microconídios em cadeias curtas; E: *F. andiyazi*. E1 – microconídios; E2 – polifiálides; E3 – formação de microconídios em falsas cabeças.

A formação de esporóquio, representada pela Figura 2.6, foi observada nas espécies *F. incarnatum – equiseti*, *F. graminearum*, *F. meridionale*, isolados do complexo *F. fujikuroi*, isolado FPC2 identificado como *Fusarium* sp. e pelo isolado FPT18, que não foi identificada a espécie.

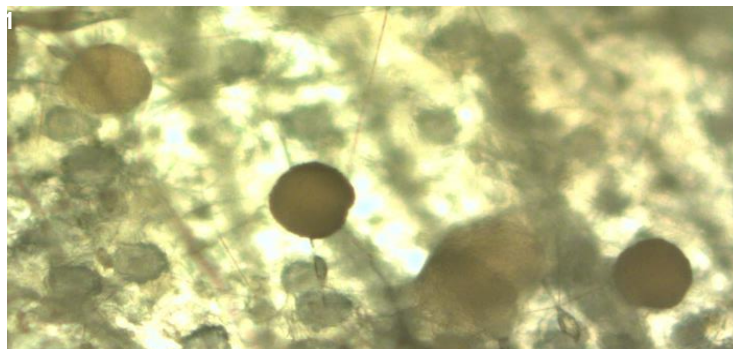


Figura 2.6 - Formação de esporodóquio.

A formação de clamidósporos em *Fusarium* sp. é comum e tem sido relatada por vários autores (HSU & LOCKWOOD, 1973; LESLIE & SUMMERELL, 2006; POLETTTO *et al.*, 200; LAZAROTTO *et al.*, 2014; WALKER *et al.*, 2016).

Verificou-se a formação de clamidósporos para os isolados das espécies *F. incarnatum – equiseti*, *F. oxysporum*, *F. graminearum*, *F. meridionale*, e o isolado identificado como *Fusarium* sp. (Figura 2.7 e Tabela 2.1), coincidindo com os trabalhos de Angelotti *et al.* (2006), Lazaratto *et al.* (2014), Maciel *et al.* (2017) e Leslie e Summerell (2006). Entretanto, a ausência de clamidósporos não significa necessariamente que determinada espécie não produza essa estrutura, uma vez que tal característica depende do meio de cultivo. De acordo com os mesmos autores, os clamidósporos são estruturas de resistência formadas em condições de estresse (HSU & LOCKWOOD, 1973).

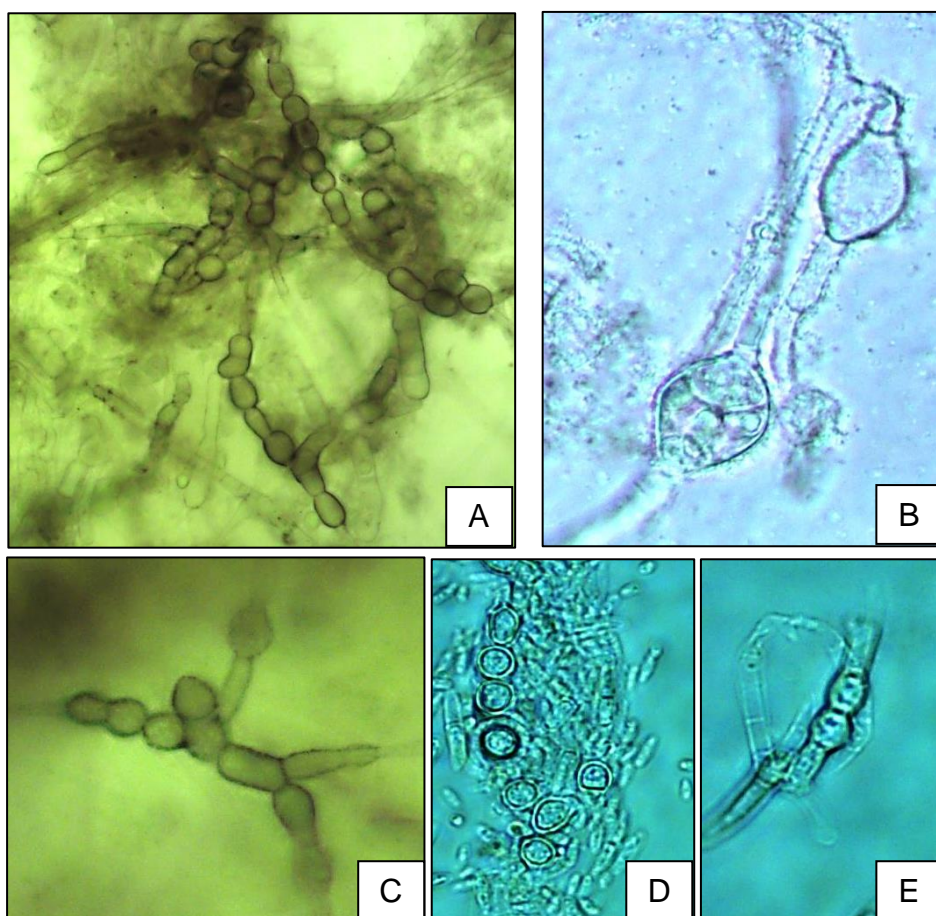


Figura 2.7 - Características morfológicas (clamidósporos) de *Fusarium* spp. em meio CLA. A: *Fusarium fujikuroi*. B: *F. meridionale*. C: *Fusarium* sp. D: *F. oxysporum*. E: *F. incarnatum – equiseti*.

Os isolados identificados como *Fusarium andiyazi* não formaram micro conídios em cadeias e não apresentaram esporodóquio (Figura 2.4 e Tabela 2.3). Segundo Leslie e Summerell (2006) essa espécie é caracterizada geralmente por apresentar produção de microconídios em abundância, em cadeias, e formação de esporodóquio em meio CFA. Martínez-Fernández *et al.* (2015) caracterizaram *F. andiyazi* com microconídios formados em cadeias bem como em falsas cabeças, coincidindo com os isolados FPT16 e FPT19 deste trabalho, e a formação de pseudoclamidósporos, o que não foi observado nos isolados estudados.

O isolado FPT7, identificado como *F. graminearum* coincidiu com as características dos trabalhos de Angelotti *et al.* (2006) e Leslie e Summerell (2006), ou seja, não houve produção de micro conídios e as dimensões dos macro conídios foram similares, além da coloração do micélio vermelho marrom. Para *F. oxysporum*, as mesmas características foram observadas em isolados provenientes de mudas

sintomáticas de erva-mate, como coloração violeta, micro conídios em monofiáides, em falsas cabeças e semelhança em formato tanto de macro conídios quanto micro conídios e presença de clamidósporos.

Outros trabalhos também podem ser encontrados descrevendo espécies de *Fusarium* por meio de caracteres morfológicos evidenciando-se que, além da variação existente entre espécies, esta ocorre entre isolados da mesma espécie, dificultando a identificação específica de *Fusarium* spp. (POLETTTO *et al.*, 2006; HAFIZI *et al.*, 2013; MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2015; MURAD *et al.*, 2016).

Na Tabela 2.3 está apresentada a média das dimensões das estruturas e os menores e maiores valores encontrados nos isolados identificados dentro de cada espécie.

A caracterização morfológica é uma ferramenta que, quando estudada isoladamente não permite obter resultados confiáveis. Quando utilizada como estudo complementar à caracterização molecular, a metodologia morfológica se torna fundamental quando surgem divergências pela molecular.

Um exemplo é o que ocorreu com o isolado FPT19 que foi identificado como duas espécies diferentes, ao se amplificar as regiões EF-1 α e RPB2 (Tabela 2.2), *F. andiyazi* e *F. verticillioides*, respectivamente. A diferença na similaridade entre as regiões é muito sutil (97,28% e 96,79%). Dessa forma, por meio da caracterização morfológica foi possível confirmar a espécie como *F. andiyazi*. A espécie *F. verticillioides* produz micro conídios em cadeias longas podendo formar pequenos aglomerados, e o isolado FPT19 produziu essas estruturas somente em falsas cabeças, o que ocorre em *F. andiyazi*.

Ambas espécies pertencem ao complexo *F. fujikuroi*, portanto possuem características comuns, o que pode causar a dificuldade na identificação da espécie. Mas quando testes complementares como morfologia com a molecular são realizados, a identificação específica de *Fusarium* se torna mais confiável.

Tabela 2.3 - Caracterização morfológica de *Fusarium* spp. provenientes de sementes de *Pinus* spp., cultivados em meio de folha de cravo agar (FCA).

Continua

Isolados	Micro conídio	Macro conídio	Clamidósporo	Espécie
FPT1, FPT2, FPT17, FPE2	Falsas cabeças em mono e polifiálides	Produção de esporodóquio. Conídios eretos com 4 a 6 septos. Célula basal em forma de pé e apical em forma de gancho a papilada. Dimensões de 20,7 – (38,4) – 64,3 µm	Presente	<i>F. incarnatum - equiseti</i>
FPT3, FPT4, FPT5, FPT6, FPT8, FPC1, FPE1	Falsas cabeças em mono e polifiálides. Ovalados, obovóides a reniformes podendo apresentar até 1 septo. Dimensões de 2,7 – (11,2) – 20,9 µm	Ausência de esporodóquio. Conídios eretos com 3 a 5 septos. Célula basal em forma de pé, podendo ser chanfrada e célula apical gancho a papilada. Dimensões de 20,1 – (42,3) – 79,6 µm	Presente	<i>F. oxysporum</i>
FPT16, FPT19	Falsas cabeças em monofiálides. Ovais a obovóides. Dimensões de 3,8 – (6,6) – 11,2 µm	Ausência de esporodóquio. Conídios eretos com 3 septos. Célula basal em forma de pé, e célula apical grossa a encurvada. Dimensões de 27,6 – (34) – 39,1 µm	Ausente	<i>F. andiyazi</i>
FPT9	Falsas cabeças e cadeias curtas em mono e polifiálides. Obovóides, reniformes e globosos. Dimensões de 7,8 – (13,7) – 21,3 µm	Ausente	Ausente	<i>F. proliferatum</i>
FPT7	Ausente	Formação de esporodóquio. Conídios eretos com 4 a 5 septos. Célula basal em forma de pé, e célula apical em gancho. Dimensões de 27,6 – (34) – 39,1 µm	Presente	<i>F. graminearum</i>
FPT20, FPE5	Ausentes	Formação de esporodóquio. Conídios com curvatura dorsal e ventral com 5 septos. Célula basal em forma de pé. Dimensões de 24,8 – (37,2) – 48,8 µm	Presente	<i>F. meridionale</i>
FPT11	Cadeias longas em monofiálides. Ovais a piriformes. Dimensões de 16,9 – (25,7) – 38,6 µm	Ausência de esporodóquio. Conídios raros, eretos com 3 a 5 septos. Dimensões de 27,4 – (42,3) – 53,7 µm	Ausente	<i>F. verticillioides</i>

Tabela 2.3 - Caracterização morfológica de *Fusarium* spp. provenientes de sementes de *Pinus* spp., cultivados em meio de folha de cravo agar (FCA).

				Conclusão
FPT10, FPT12, FPT14, FPT15, FPE3, FPE4, FPM1, FPM2, FPO	Falsas cabeças e raramente, cadeias curtas. Mono e polifiálides. Obovóides a piriforme. Dimensões de 2,2 – (7,7) – 16,7 µm	Presença de esporodóquio em um dos isolados. Conídios com curvatura dorsal e ventral com 3 a 5 septos. Célula basal em forma de pé, podendo ser entalhada e apical gancho, afilada a papilada. Dimensões de 19,8 – (48,7) – 114,2 µm	Ausente	Complexo <i>F. fujikuroi</i>
FPC2	Falsas cabeças e alguns apresentaram cadeias curtas. Mono e polifiálides. Ovais, obovóides a piriformes podendo apresentar 1 septo. Dimensões de 2,2 – (10,1) – 30,3 µm	Formação de esporodóquio em apenas um dos isolados. Conídios eretos a delgados com 3 a 5 septos. Célula basal em forma de pé a alongada e apical gancho ou afilada. Dimensões de 25,9 – (73,6) – 174,3 µm	Presentes	<i>Fusarium</i> sp.
FPT18	Falsas cabeças com FPE2 em monofiálides e FPT18 em polifiálides. Ausência de conídios em FPE2 e ovais em FPT18. Dimensões de 9,2 – (17,4) – 27,6 µm	Produção de esporodóquio apenas em FPT18. Conídios eretos com 3 a 10 septos. Célula basal em forma de pé podendo ser entalhado e apical gancho ou papilada. Dimensões de 25,5 – (44,4) – 64,6 µm	Ausente	Não identificado

Esse trabalho representa a primeira tentativa de caracterização de *Fusarium* spp. presentes em sementes de pínus no Brasil, abrangendo as principais regiões produtoras e espécies de pínus cultivadas, por meio de características moleculares, filogenéticas e morfológicas. Pode ser notado que as diferentes espécies de *Fusarium* estão distribuídas em todas as regiões produtoras de sementes de pínus no país.

4. CONCLUSÕES

Os 29 isolados de *Fusarium* spp. foram agrupados em quatro complexos de espécies: complexo *Fusarium fujikuroi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium incarnatum* e *Fusarium graminearum*, por meio de análises filogenéticas.

Por meio da amplificação das regiões EF-1α e RPB2 foi possível identificar as espécies *F. proliferatum*, *F. verticillioides*, *F. graminearum*, *F. meridionale*, *F. andiyazi*, *F. oxysporum*, *F. incarnatum – equiseti* e *F. fujikuroi* associadas às sementes de pínus, tendo a caracterização morfológica como ferramenta complementar na identificação de *Fusarium* spp.

5. REFERÊNCIAS

- ANGELOTTI, F.; TESSMANN, D.J.; ALVES, T.C.A.; VIDA, J.B.; JACCOUD FILHO, D. de S.; HARAKAVA, R. Caracterização morfológica e identificação molecular de isolados de *Fusarium graminearum* associados à giberela do trigo e triticaire no sul do Brasil. **Summa Phyttopathologica** v.32, n.2, p.177-179, 2006. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-54052006000200013>.
- BONFIELD, J; BEAL, K; JORDAN, M; CHEN, Y; STADEN, R. **The Staden Package Manual**, Cambridge, UK, 2006.
- CARLUCCI, A.; COLATRUGLIO, L.; FRISULLO, S. First report of pith canker caused by *Fusarium circinatum* on *Pinus halepensis* and *P. pinea* in Apulia (southern Italy). **Plant Disease**. 91:12, p.1683, 2007. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-91-12-1683C>.
- CHANG, K.F.; HWANG, S.F.; CONNER, R.L., AHMED, H.U.; ZHOU, Q.; TURNBULL, G.D.; STRELKOV, S.E.; MCLAREN, D.L.; GOSSEN, B.D. First report of *Fusarium proliferatum* causing root rot in soybean (*Glycine max* L.) in Canada **Crop Protection**, v.67, p.52-58, 2015. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-07-15-0766-PDN>.
- DAL PRA, M.; TONTI, S.; PANCALDI, D.; NIPOTI, P.; ALBERTI, I. First report of *Fusarium andiyazi* associated with rice bakanae in Italy. **Disease Notes**. v.94, n.8, p.1070, 2010. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-94-8-1070A>.
- DARIVA, J.M.; XAVIER, A.A.; COSTA, M.R.; RIBEIRO, R.C.F.; SOUSA, T.V. Variabilidade genética de isolados de *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* associados ao maracujazeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura** v.37, n.2, p.377-386, 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/0100-2945-119/14>.
- DICK, M.A. e DOBBIE, K. Species of *Fusarium* spp. on *Pinus radiata* on New Zeland. **New Zealand Journal of Plant Protection**. 55, p.58 – 62, 2002.
- GAI, X.T.; YANG, R.X.; PAN, X.J.; YUAN, Y.; WANG, S.N.; LIANG, B.B.; GAO, Z.G. First Report of *Fusarium incarnatum* Causing Stalk Rot on Maize in China. **Disease Notes**. v.100, n.5, p.1010, 2016. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-07-15-0766-PDN>.
- GEISER, D.M.; JIMÉNEZ-GASCO, M.M.; KANG, S.; MAKALOWSKA, I.; VEERARAGHAVAN, N.; WARD, T.J.; ZHANG, N.; KULDAU, G.A.; O'DONNELL, K. FUSARIUM-ID. v.1.0. A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. **European Journal of Plant Pathology**. v. 110, n.5-6, p.473-479, 2004. doi: 10.1007/978-1-4020-2285-2_2.
- HAFIZI, R.; SALLEH, B.; LATIFFAH, Z. Morphological and molecular characterization of *Fusarium solani* and *F. oxysporum* associated with crown disease of oil palm. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.44, n.3, p.959-968, 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822013000300047>

HSU, S.C.; LOCKWOOD, J.L. Chlamydospore formation in *Fusarium* in sterile salt solutions. **Phytopathology**. v.63, p.597-602, 1973.

KURAMAE, E.E. e SOUZA, N.L. Variabilidade genética entre formae speciales de *Fusarium oxysporum* e raças 1 e 2 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* através de RAPD e sequências de regiões ITS e rDNA. **Acta Scientiarum. Agronomy**. v.24, n.5, p.1481-1485, 2008. <http://dx.doi.org/10.4025/actasciagron.v24i0.2409>.

LAZAROTTO, M.; MILANESI, P.M.; MUNIZ, M.F.B.; REINIGER, L.R.S.; BELTRAME, R.; HARAKAVA, R.; BLUME, E. Morphological and molecular characterization of *Fusarium* spp. pathogenic to pecan tree in Brazil. **Genetics and Molecular Research**. v.13, n.4, p.9390-9402, 2014. DOI:10.4238/2014.November.11.5.

LESLIE, J.F., B.A. SUMMERELL, 2006. **The Fusarium laboratory manual**. Blackwell Publishing Professional, Iowa.

MACHADO, F.J.; MÖLLER, P.A.; NICOLLI, C.P.; DEL PONTE, E.M. First Report of *Fusarium graminearum*, *F. asiaticum*, and *F. cortaderiae* as Head Blight Pathogens of Annual Ryegrass in Brazil. **Disease Notes**. v.99, n.12, p.1859, 2015. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-04-15-0376-PDN>.

MACIEL, C.G., WALKER, C., SANTOS, R.F.dos, MUNIZ, M.F.B., BRUM, D.L. *Fusarium oxysporum* and *F. verticillioides* associated with damping-off in *Pinus* spp. **Rev. Ciência Agronômica**. v.48, p.134-141, 2017. DOI: 10.5935/1806-6690.20170015

MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, E.; MARTÍNEZ-JAÍMES, P.; SÁNCHEZ, D.G.; PEÑACHORA, G.; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, V.C. Diversidad de *Fusarium* en las raíces de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) en el estado de Morelos, México. **Revista Mexicana de Micología**, v.42, p.33-43, 2015. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-31802015000200006&lng=es&tlng=pt.

MURAD, N.B.A.; KUSAI, N.A.; ZAINUDIN, N.A.I.M. Identification and diversity of *Fusarium* species isolated from tomato fruits. **Journal of Plant Protection Research**. v.56, n.3, p.231-236, 2016. Doi: 10.1515/jppr-2016-0032.

PERES, A.P.; SILVA-MANN, R.; VIEIRA, M. das G.G.C.; MACHADO, J.D. Variabilidade morfocultural e genética de fungos associados à podridão peduncular do mamão. **Ciências Agrotécnicas**. v.27, n.5, p.1053-1062, 2003.

PÉREZ-SIERRA, A.; LANDERAS, E.; LEÓN, M.; BERBEGAL, M.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; ARMENGOL, J. Characterization of *Fusarium circinatum* from *Pinus* spp. in northern Spain. **Mycological Research**. v.111, n.7, p.832-839, 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mycres.2007.05.009>.

PFENNING, L.H.; COSTA, S.S.; MELO, M.P.; COSTA, H.; VENTURA, J.A.; AUER, C.G. & SANTOS, A.F. dos. First report and characterization of *Fusarium circinatum*, the causal agent of pitch canker in Brazil. **Tropical plant pathology**, Brasília , v. 39, n. 3, p. 210-216, 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S1982-56762014000300004>.

POLETTTO, I.; MUNIZ, M.F.B.; CECONI, D.E.; SANTIN, D.; WEBER, M.N.D.; BLUME, E. Zoneamento e identificação de *Fusarium* spp. causadores de podridão de raízes em plantios de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.–Hil) na região do vale do Taquerí, RS. **Ciência Florestal**. v.16, n.1, p.1-10, 2006.

QUESADA-OCAMPO, L.M.; AL-HADDAD, J.; SCRUGGS, A.C.; BUELL, C.R.; TRAIL, F. Susceptibility of Maize to Stalk Rot Caused by *Fusarium graminearum* Deoxynivalenol and Zearalenone Mutants. **Phytopathology**. v.106, n.8, p.920-927, 2016. Doi: <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-09-15-0199-R>.

REHNER, S.A.; MINNIS, A.M.; SUNG, G.H.; LUANGSA-ARD, J. J.; DEVOTTO, L. ; HUMBER, R.A. Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. **Mycologia**, v. 103, n.5, p.1055-1073, 2011. doi: 10.3852/10-302.

SALERNO, M.I.; LORI, G.A. Association of seed-born *Fusarium* species on *Pinus ponderosa* with germination and seedling viability in Argentina. **Forest Pathology**. v.37, n.4, p.263-271, 2007. doi: 10.1111/j.1439-0329.2007.00505.x.

SCHROERS, H.J.; O'DONNELL, K.; LAMPRECHT, S.C.; KAMMEYER, P.L.; JOHNSON, S.; SUTTON, D.A.; RINALDI, M.; GEISER, D.M.; SUMMERBELL, R.C. Taxonomy and phylogeny of the *Fusarium dimerum* species group. **Mycologia**. v.101, n.1, p.44-70. 2009. doi: 10.3852/08-002.

STEENKAMP, E.T., RODAS, C.A., KVAS, M., WINGFIELD, M.J. *Fusarium circinatum* and pitch canker of *Pinus* in Colombia. **Australasian Plant Pathology**. v.41, n.5, p.483-491, 2012. Doi: 10.1007/s13313-012-0120-z

STEWART, J.E.; OTTO, K.; CLINE, G.A.; DUMROESE, R.K.; KLOPFENSTEIN, N.B.; KIM, M.S. First report of *Fusarium proliferatum* causing fusarium root disease on sugar pine (*Pinus lambertiana*) in a forest container nursery in California. **Plant Disease**. v.100, n.12, p.2534, 2016. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-06-16-0909-PDN>.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. Mega 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**. v. 24, p. 1596-1599, 2006.

TAMURA K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMER, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**. v.28, n.10, p. 2731-2739, 2011. doi: 10.1093/molbev/msr121.

THOMPSON J.D.; HIGGINS D.G.; GIBSON T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**. v.22, n.22, p.4673–4680, 1994. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>.

VENTURA, J.A. 2000. Taxonomia de *Fusarium* e seus segredos. Parte II – chaves para identificação. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. v.8, p.303-338.

WALCOTT, R.R. Detection of seedborne pathogens. **Hort Technology**. v.13, n.1, p.40-47. 2003.

WALKER, C.; MACIEL, C.G.; MILANESI, P.M.; MUNIZ, M.F.B.; MEZZOMO, R. POLLET, C.S. Caracterização morfológica, molecular e patogenicidade de *Fusarium acuminatum* e *Fusarium verticillioides* a *Cordia americana*. **Ciência Florestal**. v.26, n.2, p. 463-473, 2016. <http://dx.doi.org/10.5902/1980509822747>.

Capítulo 3 – CONTROLE BIOLÓGICO DE *Fusarium* spp. POR *Trichoderma atroviride* EM SEMENTES DE PÍNUS.

RESUMO: O uso de micro-organismos benéficos no controle de fitopatógenos e na promoção do crescimento de plantas são alternativas para espécies florestais, cujas sementes são potenciais veículos de disseminação de fitopatógenos. O objetivo desse trabalho foi testar isolados do gênero *Trichoderma* provenientes de sementes florestais nativas e exóticas quanto ao potencial de controle de *Fusarium meridionale* e isolado do complexo *F. fujikuroi* em sementes de *P. taeda* e *P. elliotii* var. *elliotii*. O ensaio *in vitro* foi realizado por meio de confrontação direta entre isolados de *Trichoderma* e *Fusarium*. Os isolados mais promissores foram testados *in vivo* para tratamento de sementes. As sementes de *P. taeda* foram primeiramente inoculadas com *F. meridionale* e *P. elliotii* var. *elliotii* com um isolado do complexo *F. fujikuroi*, e posteriormente as sementes foram imersas em suspensão de *Trichoderma* sp. a 10^8 conídios/mL. Após, as sementes foram semeadas em tubetes com vermiculita sendo utilizadas cinco repetições com 20 sementes cada. Após 90 dias da semeadura, foram avaliadas emergência de plântulas e mudas com sintomas de amarelecimento de acículas e tombadas, e após cinco meses da semeadura, foram avaliados diâmetro de coleto (Dc), comprimento de parte aérea (CA) e radicular (CR), peso seco de parte aérea (PSA) e radicular (PSR), relação diâmetro de coleto e altura (Dc/CA) e de altura e diâmetro de coleto (CA/Dc). *Trichoderma* sp. foram eficientes no antagonismo de *Fusarium* spp. *In vivo*, *Trichoderma atroviride* proporcionou aumento no diâmetro de coleto e na relação diâmetro de coleto e altura de plântulas de *P. taeda* e *P. elliotii* var. *elliotii*, bem como no comprimento aéreo e na relação comprimento aéreo e diâmetro de coleto de plântulas de *P. elliotii* var. *elliotii*.

Palavras-chave: fusariose, biocontrole; promoção do crescimento.

Chapter 3 - BIOLOGICAL CONTROL OF *Fusarium* spp. BY *Trichoderma atroviride* IN PINE SEEDS

ABSTRACT: The use of beneficial microorganisms in the control of plant pathogens and the promotion of plant growth are alternatives for forest species, whose seeds are potential vehicles for the dissemination of plant pathogens. The objective of this work was to test isolates of the *Trichoderma* kind from native and exotic forest seeds regarding the control potential of *Fusarium* spp. in *P. taeda* and *P. elliotii* var. *elliotii* seeds. The *in vitro* test was performed by the means of direct comparison between isolates of *Trichoderma* sp. and *Fusarium* sp. The most promising isolates were tested *in vivo* for seed treatment. *P. taeda* seeds were first inoculated with *F. meridionale* and *P. elliotii* var. *elliotii* with an isolate from the *F. fujikuroi* complex, and later the seeds were immersed in a suspension of *Trichoderma* sp. at 10^8

conidia/mL. Subsequently, they were seeded in vermiculite tubes. Five replicates with 20 seeds each were used. 90 days after the seeding, the emergence of seedlings and saplings with symptoms of yellowing of needles and fallen leaves were noticed, and after five months of seeding, the diameter of the sample (Ds), aerial part length (AL) and radicular part length (RL), aerial part dry weight, (ADW) and radicular part dry weight (RDW), the ratio of the sample diameter and height (Ds/AL) and height and sample diameter (AL/Ds) were evaluated. *Trichoderma* sp. were efficient in the antagonizing the *Fusarium* spp. *In vivo*, *Trichoderma atroviride* improved Ds and Ds/AL of *P. taeda* and *P. elliotii* var. *elliotii* seedlings and AL and DS/AL of *P. elliotii* var. *elliotii*,

Keywords: *Fusarium*, biocontrol; growth promotion.

1. INTRODUÇÃO

A área de pínus (*Pinus* spp.) no Brasil ocupa cerca de 1,6 milhões de hectares e atende a demanda crescente da indústria madeireira (IBÁ, 2016). Este cenário implica no aumento da demanda de sementes e mudas, que constituem insumo básico nos programas de recuperação e/ou conservação de ecossistemas, e reflorestamentos para fins comerciais (SARMENTO & VILLELA, 2010; SANTOS *et al.*, 2011). Implica, também, na necessidade de se conhecer e controlar os patógenos veiculados pelas sementes, os quais podem causar danos na produção de mudas e disseminação de patógenos para áreas novas (CARNEIRO, 1986; MENTEN, 1991).

Dentre as formas de controle existentes, o uso de agentes de biocontrole contra patógenos associados às sementes é relevante, pois pode alcançar grande eficácia (WHIPPS, 2001), o que é de grande interesse, visto que há falta de produtos químicos registrados para culturas florestais (SANTOS *et al.*, 2011).

Muitos micro-organismos que atuam como agentes de biocontrole de patógenos podem apresentar outros efeitos benéficos como a promoção do crescimento das plantas, provendo nutrientes essenciais e ajudando as plantas a superar estresses ambientais (HALLMAN *et al.*, 1997; MASTRETTA *et al.*, 2009). O biocontrole tem ainda a vantagem de cumprir com o crescente interesse social e ambiental na busca de métodos alternativos de controle de doenças de plantas.

Em espécies florestais, são poucos os trabalhos que visam identificar e analisar o potencial de micro-organismos benéficos presentes em sementes destas plantas (WHIPPS, 2001). Dentre os poucos trabalhos realizados, Silva *et al.* (2006) relataram uma diversidade de fungos endofíticos presentes em pinha e comprovaram que esses micro-organismos proporcionaram o crescimento de plantas dessa cultura. Maciel *et al.* (2014) comprovaram a ação de biocontrole de *Trichoderma* spp. quando pareado com *Fusarium sambucinum*, o qual é patogênico a *P. elliottii* var. *elliottii*. O uso de fungos do gênero *Trichoderma* beneficiou a sobrevivência de miniestacas de eucalipto, proporcionando maior taxa de enraizamento e também se mostrou eficiente no tratamento de sementes de cedro sem prejudicar a germinação (FORTES *et al.*, 2007; LAZAROTTO *et al.*, 2009).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar isolados de *Trichoderma* de sementes florestais quanto ao seu potencial de controle de *Fusarium* spp. em

sementes de pínus e avaliar a capacidade dos mesmos em promover o crescimento inicial de plântulas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Isolamento de *Trichoderma* spp.

Os fungos do gênero *Trichoderma* foram obtidos de sementes florestais nativas (*Senna multijuga* L. C. Rich., *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub., *Sebastiania commersoniana* (Baill.) L. B. Sm. Et Downs, *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit, *Alophylus edulis* (A.St. – Hil., Cambess. Et A. Juss.) Radlk., *Lonchocarpus campestris* Mart. ex Benth, *Mimosa bimucronata* (de Candolle, O. Kuntze), *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) J. F. Mac br., *Cordia americana* (L.) Gottshling & J.E.Mill., *Handroanthus heptaphyllus* (Vell.) Mattos, *Phytolacca dioica* L., *Schefflera morototoni* (Aubl.) Maguire, Steyererm. & Frodin e *Drymis winteri* J.R. Forst. & G. Forst.) e exóticas (*P. caribaea* Morelet var. *hondurensis* (Sénécl), *P. elliotii* Engelm. var. *elliotii*, *Pinus greggii* Engelm., *Pinus maximinoi* H.E.Moore, *Pinus oocarpa* Schiede ex Schltdl., *Pinus patula* Schl. & Chan, *Pinus taeda* L. e *Pinus tecunumanii*) cultivadas em diferentes regiões do estado do Paraná.

Para o isolamento endofítico de *Trichoderma* sp., as sementes foram previamente desinfestadas em álcool 70% (v/v) por um min, quatro min em solução de hipoclorito de sódio 1% (v/v), novamente em álcool 70% (v/v) por 30 s e por último lavadas em água ultrapurificada esterilizada (SANTOS *et al.*, 2011). Posteriormente, as sementes foram depositadas em placas de Petri contendo meio BDA e incubadas a 24 °C em BOD até o aparecimento das colônias.

Realizou-se também Blotter test sem desinfestação das sementes. Após o aparecimento de crescimento fúngico, típico de *Trichoderma*, foram repicados para outras placas de Petri contendo meio batata-dextrose-agar (BDA). As placas foram incubadas a 28 °C, por cinco dias. Posteriormente, foram repicados para tubos de ensaio contendo meio BDA, e preservados em geladeira.

2.2 Antagonismo em culturas confrontadas

Cada isolado de *Trichoderma* foi confrontado com um isolado de *Fusarium meridionale*, três isolados do complexo *Fusarium fujikuroi* e um isolado de *F. oxysporum* pertencentes à coleção do laboratório de patologia florestal da Embrapa Florestas, Colombo – PR que foram selecionados de estudos prévios de patogenicidade em mudas de pínus (Capítulo 1).

Repicou-se um disco de micélio de cinco mm de diâmetro de *Trichoderma* sp. a dois cm de distância da borda de uma placa de Petri contendo meio BDA, e um disco de micélio do patógeno de mesma dimensão, do outro lado da placa, também a aproximadamente dois cm da borda da placa. As placas foram incubadas a 25 °C, por sete dias, com fotoperíodo de 12 horas. A testemunha foi constituída por placas de Petri contendo meio BDA, com apenas um disco do patógeno a dois cm da borda da mesma.

As placas foram avaliadas após sete dias, medindo-se os dois diâmetros, perpendiculares entre si com um paquímetro digital, do crescimento da colônia do patógeno e determinada a taxa de inibição do crescimento do patógeno por meio da fórmula: $\% \text{ inibição} = \left(\frac{Cr_{\text{test}} - Cr_{\text{trat}}}{Cr_{\text{test}}} \right) \times 100$, em que cr_{test} = crescimento radial da testemunha; e cr_{trat} = crescimento radial do tratamento (EDGINGTON *et al.*, 1971). O teste foi montado em delineamento inteiramente casualizado, com 3 repetições para cada antagonista. Foi realizado a ANOVA, e as médias comparadas pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade de confiança.

2.3 Tratamento de sementes de pínus contaminadas com *Fusarium meridionale* e um isolado pertencente ao complexo *F. fujikuroi*, com *Trichoderma atroviride*

O experimento com sementes foi montado apenas com as espécies *P. taeda* e *P. elliotii* var. *elliotii*. Foram selecionados os melhores isolados de *Trichoderma* spp. que apresentaram maior porcentagem de inibição de crescimento de *F. meridionale* patogênico a *P. taeda*, um isolado do complexo *F. fujikuroi* patogênico ao *P. elliotii* var. *elliotii*, bem como dois isolados que foram eficientes para todos os isolados de *Fusarium* spp. testados *in vitro*.

Os isolados de *Trichoderma* utilizados no ensaio de tratamento de sementes foram identificados por meio da amplificação da região que codifica a segunda maior subunidade da RNA polimerase II (RPB2). O DNA foi extraído do micélio utilizando-se o kit Wizard® Genomic DNA Purification da Promega. As culturas foram crescidas em meio BDA e o micélio foi raspado com um bisturi esterilizado e pesado 0,4 g. Após a extração, a qualidade do DNA foi avaliada em gel de agaroso 0,8 % (v/v).

As amostras de DNA foram submetidas à PCR para amplificação da região RPB2 utilizando-se os *primers* 7cf (5' ATGGGYAARCAAGCYATGGG3 ') e 11ar (5' GCRTGGATCTTRTCRTCSACC 3'). A reação foi preparada para um volume final de 25 µL, contendo aproximadamente 30ng de DNA, tampão 1x, 2,5 µM de dNTP, 3 mM de MgCl₂, 10 µM de cada *primer* e 0,2 unidades da enzima Taq polimerase. A amplificação foi realizada em termociclador sob as seguintes condições: 96 °C por 5 min; 30 ciclos de 94 °C por 30 s, 52 °C por 30 s e 72 °C por 1 min; extensão final de 72 °C por 8 min. A amplificação gerou fragmentos de aproximadamente 800 pares de bases (pb).

Os produtos da PCR foram purificados com acetato de amônio e foram sequenciados em sequenciador Mega BACE 500 (Amersham). As sequências obtidas foram editadas com o auxílio do pacote do programa Staden versão 1.6 (BONFIELD *et al.* 2006) e alinhadas pelo programa MEGA versão 4.0 (TAMURA *et al.* 2006). As sequências foram comparadas com outras sequências existentes no banco de dados Fusarium - ID pelo programa BLAST, permitindo a detecção de similaridade com sequências caracterizadas já depositadas.

Sementes de *P. taeda* e *P. elliotii* var. *elliotii* foram desinfestadas conforme metodologia descrita no ensaio *in vitro*. As sementes foram inoculadas por meio de contato direto com o micélio do patógeno em meio BDA, em que *P. taeda* foi inoculada com *F. meridionale* e *P. elliotii* var. *elliotii* com o isolado do complexo *F. fujikuroi*; onde permaneceram em contato por 48 h a 24 °C. Após, as sementes foram imersas em suspensão ajustada para 10⁸ conídios/mL de cada isolado de *Trichoderma* sp. por 30 min e, então, as sementes foram semeadas em bandejas de isopor contendo vermiculita esterilizada, sendo uma semente por célula. As bandejas foram mantidas em casa de vegetação até o final do ensaio. A testemunha foi constituída por sementes microbiolizadas apenas com o patógeno.

Após 90 dias da semeadura, foram avaliadas emergência de plântulas e número de plântulas sintomáticas. Após cinco meses da semeadura, foram

avaliados diâmetro de coleto (Dc) com o uso de um paquímetro digital, comprimento de parte aérea (CA) e radicular (CR) com o uso de uma régua, pesados o peso seco de parte aérea (PSA) e radicular (PSR), e calculado a relação diâmetro de coleto e altura (Dc/CA) e de altura e diâmetro de coleto (CA/Dc).

O ensaio foi montado em delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições de 20 sementes, para cada tratamento. Foi realizado a ANOVA e quando pertinente, foi realizado o teste Tukey a 5 % de significância. O experimento foi repetido duas vezes.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos 56 isolados de *Trichoderma* spp. , sendo 13 endofíticos e 43 epifíticos (Tabela 3.1).

No ensaio de confrontação entre *Trichoderma* sp. e *Fusarium* spp., o antagonista foi capaz de inibir até 78 % do crescimento micelial de *F. meridionale* (FPT20), 68,4 % (FPE3), 43 % (FPM2) e 73 % (FPO), isolados do complexo *F. fujikuroi*, e 71,5 % de inibição de *F. oxysporum* (FPC1) (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 - Taxa de inibição do crescimento micelial de *Fusarium fujikuroi* (isolados FPM2, FPO e FPE3), *Fusarium meridionale* (isolado FPT20) e *F. oxysporum* (isolado FPC1) por *Trichoderma* sp. em meio BDA, a 24 °C, com fotoperíodo de 12 h, por sete dias.

Continua

Isolado de <i>Trichoderma</i>	FPM2	FPO	FPT20	FPE3	FPC1
Inibição do crescimento micelial (%)					
TPM1	30,6 b	12,3 c	53,7 c	55,2 a	59 a
TPM2	30 b	53,7 b	59,6 b	57 a	64,5 a
TPM3	29,6 b	50 b	67,3 a	54,7 a	54,2 a
TPM4	26,5 b	59,7 b	64,6 b	56,2 a	59 a
TPM5	19,1 c	64,4 a	69 a	58,8 a	71,5 a
TPM7	35,2 a	48,4 b	72,2 a	51,4 b	54,9 a
TPE1	25 b	51,9 b	63,8 b	57,8 a	48,4 b
TPE2	22,3 c	64,8 a	53,9 c	48,3 b	47,7 b
TPE3	12,1 c	56,6 b	37,7 d	51,9 b	52 b
TPE4	14,4 c	48,6 b	48,1 c	41,7 b	50,4 b
TPE5	20,8 c	67,3 a	63,1 b	46,8 b	60,2 a
TPPNE1	31,3 b	63,8 a	60,7 b	54,5 a	54,2 a
TPPNE2	20,8 c	57,6 b	73,7 a	20,6 c	37,9 c
TPPNE3	21 c	66,5 a	69,9 a	53,7 a	36,2 c
TPPNE4	28,1 b	60,1 b	76,1 a	47,6 b	50,6 b
TPPNE5	24 c	59,7 b	66,9 a	52,2 b	48 b
TPPNE6	41,4 a	60,5 b	69,7 a	54,2 a	61,6 a
TPPNE7	43 a	68,1 a	71 a	53,7 a	60,9 a
TPPNE8 (<i>T. atroviride</i>)	37,4 a	68,7 a	73,2 a	65,9 a	62,6 a
TPPNE9	25,9 b	53,3 b	67,7 a	61,6 a	60,9 a
TPPNE10	15,5 c	56,2 b	69,8 a	62,6 a	62,4 a
TPPNE11	22,4 c	65,4 a	74,2 a	60,8 a	62,1 a
TPPNE12	28,7 b	59,9 b	73,2 a	50,6 b	58,8 a
TPPNE13	24,8 b	59,3 b	64,7 b	58 a	61,4 a
TPPNE14	28,6 b	57,6 b	66,8 a	58,5 a	60,4 a
TPPNE15	29,8 b	58 b	69,7 a	50,1 b	59,2 a
TPtecNE1	17,3 c	55,3 b	72,2 a	56,2 a	59 a
TPtecNE2	23,9 c	52,7 b	73,1 a	54,5 a	60 a
TPtecNE3	21 c	64,4 a	72,4 a	60,3 a	60 a
TPtecNE4 (<i>T. atroviride</i>)	36,8 a	66 a	70,5 a	68,4 a	54,9 a
TPtecNE5 (<i>T. atroviride</i>)	29,9 b	58,2 b	68,5 a	68,2 a	45,8 b
TPtecNE6	37,5 a	63,6 a	72,5 a	60,8 a	50,1 b
TPtecNE7	32,6 b	67,5 a	61,2 b	57,5 a	46 b
TPtecNE8	21,1 c	64,4 a	66,1 a	61,1 a	50,1 b
TPtecNE9	22,7 c	67,7 a	72 a	55,2 a	46,3 b
TPONE1	22,9 c	64,4 a	78,8 a	59,5 a	40,3 c
TPONE2	14 c	58,2 b	62,7 b	43,5 b	38,8 c
TPONE3	18,2 c	68,9 a	75,9 a	16,5 c	9,8 d

Tabela 3.1 - Taxa de inibição do crescimento micelial de *Fusarium fujikuroi* (isolados FPM2, FPO e FPE3), *Fusarium meridionale* (isolado FPT20) e *F. oxysporum* (isolado FPC1) por *Trichoderma* sp. em meio BDA, a 24 °C, com fotoperíodo de 12 h, por sete dias.

					Conclusão
TPONE4	17,9 c	62,6 a	71,7 a	52,4 b	39,1 c
TPONE5	14,9 c	61,5 a	70,2 a	46,8 b	42,2 c
TPONE6	12,5 c	59,5 b	71,4 a	44,5 b	42 c
TPONE7	26,3 b	67,3 a	65,3 a	41,5 b	44,4 c
TPONE8	15,2 c	60,5 b	68,3 a	39,2 b	13,7 d
TPONE9	27,9 b	73 a	69,2 a	52,7 b	45,8 b
TPONE10	15,7 c	62,6 a	49,6 c	54,5 a	50,4 b
TPMNE1	17,6 c	69 a	75,6 a	52,9 a	42,5 c
TPMNE2	26,8 b	63,8 a	62,1 b	49,4 b	55,6 a
TPMNE4	32,7 b	66 a	62,4 b	59 a	53,7 a
TPMNE5	26,4 b	61,3 a	67,2 a	38,9 b	55,9 a
TPMNE6	19,3 c	59,5 b	62,1 b	49,9 b	51,3 b
TPMNE7	18,8 c	59,5 b	55,6 c	45 b	52 b
TPMNE8	17,7 c	56,6 b	67,9 a	46,8 b	53,7 a
TPMNE9	32 b	62,1 a	58,8 b	47,8 b	57,6 a
TCD1	30,3 b	66,7 a	73,6 a	53,7 a	63,8 a
TCD2	28,7 b	66,7 a	61,3 b	52,2 b	53,5 a
TEST	0 c	0 d	0 e	0 d	0 e

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott Knott, a 5% de significância.

Resultados parecidos foram observados por Maciel *et al.* (2014) quando confrontaram *Trichoderma* spp. com *F. sambucinum*. Estes autores detectaram uma inibição de crescimento micelial do patógeno de até 63%. Martínez-Álvarez *et al.* (2012) observaram que *T. viride* inibiu o crescimento micelial de *F. circinatum* em até 60 %. No presente trabalho, as taxas de inibição de crescimento micelial dos patógenos, foram maiores, chegando a 78%, e também foi observado que *Trichoderma* spp. chegou a colonizar o patógeno, crescendo sobre a cultura de *Fusarium* spp. (Figura 3.1). Essa habilidade em colonizar a cultura do patógeno já foi observada por outros autores como Bankole e Adebajo (1996), Carvalho *et al.* (2011) e Moraga-Suazo *et al.* (2011).

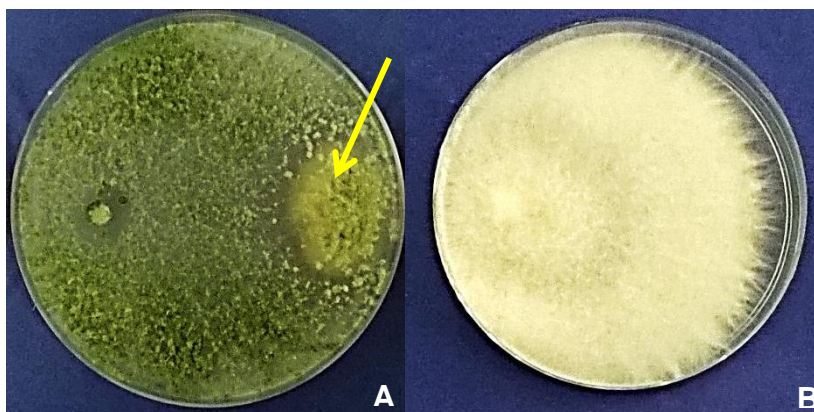


Figura 3.1 - Ensaio pareamento de *Trichoderma atroviride* com *Fusarium* spp. A: *Trichoderma* spp. crescendo sobre a colônia de *Fusarium* spp. indicado pela seta. B: Testemunha.

A partir do teste de confrontação de culturas, foram selecionados os isolados TPTecNE 4 e TPPNE8 que inibiram o crescimento micelial de todos os isolados de *Fusarium* (FPT20, FPE3, FPO, FPM2 e FPC1), o isolado TPONE1 que foi o que apresentou maior taxa de inibição de *F. meridionale* (FPT20) e o isolado TPTecNE5 que foi o melhor para inibição do crescimento micelial do isolado FPE3 pertencente ao complexo *F. fujikuroi*, para serem usados no teste de tratamento de sementes.

Os isolados TPTecNE4, TPPNE8 e TPTecNE5 foram identificados como *Trichoderma atroviride*, por meio da amplificação da região RPB2. Não foi possível a identificação do isolado TPONE1 pela qualidade do DNA extraído e dificuldade na reação de PCR.

Sementes de pinus contaminadas com *Fusarium* spp. quando tratadas com *Trichoderma* spp., não apresentaram aumento no número de plântulas emergidas e também não houve redução na incidência de plântulas sintomáticas (Tabela 3.2), fato também relatado por Maciel *et al.* (2014) que após 42 dias de semeadura de *P. elliotii* var. *elliotii* inoculadas com *Fusarium sambucinum* e tratadas com o antagonista *Trichoderma* spp. não observaram efeito sobre emergência e plântulas sintomáticas. Martínez-Álvarez *et al.* (2012) ao semear sementes de *P. radiata* em substrato contendo suspensão de *F. circinatum* e de *T. viride* verificaram que o antagonista não protegeu as plântulas contra a mortalidade causada por *F. circinatum*, entretanto houve redução na incidência de plântulas mortas de 93,7 % para 59,1 %).

A diferença entre resultados em condições *in vitro* e *in vivo* pode ser devido a fatores ambientais (temperatura e umidade), que influenciam tanto os micro-organismos como a própria planta, bem como a relação entre antagonistas e hospedeiros, patógeno e hospedeiro, antagonista e patógeno e a relação dos três fatores (ALFENAS *et al.*, 2009). Por outro lado, outros autores, como Lazarotto *et al.* (2013), observaram que o uso de *Trichoderma* sp. no tratamento de sementes foi eficiente no controle de *Rhizoctonia* sp. em sementes de cedro e Junges *et al.* (2016) no controle de fungos associados a sementes de canafístula.

Tabela 3.2 - Emergência (%) de plântulas e porcentagem de plântulas doentes (%) oriundas de sementes de pinus contaminadas com *Fusarium meridionale* e *Fusarium fujikuroi* e tratadas com *Trichoderma atroviride*.

Sementes de <i>P. taeda</i> pré-inoculadas com <i>F. meridionale</i>				
Isolado <i>T. atroviride</i>	Experimento I		Experimento II	
	Emergência (%)	Plântulas sintomáticas (%)	Emergência (%)	Plântulas sintomáticas (%)
TPTecNE4	17 A	15 A	30 A	28,6 A
TPPNE8	13 A	16 A	16 B	48 A
TPONE1	15 A	0 A	12 B	16,7 A
TESTEMUNHA	18 A	25 A	38 A	27,8 A
Sementes de <i>P. elliottii</i> var. <i>elliottii</i> pré-inoculadas com um isolado do complexo <i>F. fujikuroi</i>				
Isolado <i>T. atroviride</i>	Experimento I		Experimento II	
	Emergência (%)	Plântulas sintomáticas (%)	Emergência (%)	Plântulas sintomáticas (%)
TPTecNE4	52 A	26,1 A	78 A	7,7 A
TPPNE8	47 A	13,6 A	55 B	13,5 A
TPTecNE5	41 A	18 A	66 AB	12,2 A
TESTEMUNHA	32 A	37,7 A	67 AB	10,4 A

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de confian

Para parâmetros de crescimento, o diâmetro de coleto (Dc) e a relação diâmetro de coleto e comprimento aéreo (Dc/CA) foram melhores em plântulas de *P. taeda* tratadas com *T. atroviride* (isolado TPtecNE4) e sementes de *P. elliottii* var. *elliottii* tratadas com o isolado TPPNE8 de *T. atroviride* apresentaram incremento do comprimento aéreo (CA), do diâmetro de coleto (Dc) e na relação comprimento aéreo e diâmetro de coleto (CA/Dc) nas plântulas (Tabela 3.3), comprovando-se o potencial do uso desses micro-organismos.

Estes dados demonstram o potencial do uso em produção massal de mudas em viveiros, melhorando a qualidade das mudas observada por meio de dados como relação de CA/Dc, Dc/CA, Dc e CA e, conseqüentemente, influenciando na capacidade das mesmas em sobreviverem a condições adversas. O desenvolvimento inicial das plântulas é uma fase sensível em que as mudas estão mais expostas a patógenos. Dessa forma, a presença de *Trichoderma* sp. que afeta positivamente o crescimento inicial das plântulas, conforme relatado, proporciona plântulas mais vigorosas e, conseqüentemente, menos susceptíveis ao ataque de patógenos.

Resultados similares foram relatados por Junges *et al.* (2016) em que *Trichoderma* spp. também promoveram o crescimento das plântulas de canafístula, angico e e cedro, confirmando a possibilidade do uso de *Trichoderma* sp. para o tratamento de sementes. Hohmann *et al.* (2011) verificaram que *Trichoderma hamatum* promoveu o crescimento de brotos e de raízes de *P. radiata* e que o uso desse antagonista como revestimento de sementes e como aplicação por pulverização foram eficientes na promoção do crescimento de plântulas de *P. radiata*.

Tabela 3.3 - Diâmetro de coleto (Dc em mm), comprimento de parte aérea (CA em cm), Peso Seco de parte Aérea (PSA em mg), Comprimento Radicular (CR em cm), Peso Seco de Parte Radicular (PSR em mg), Relação CA/Dc, Relação Dc/CA e índice de Qualidade de Dickson (IQD) de plântulas de pinus oriundas de sementes contaminadas com *Fusarium* spp., tratadas com *Trichoderma atroviride*.

Sementes de <i>P. taeda</i> contaminadas com <i>F. meridionale</i> (Exp. I)								Sementes de <i>P. taeda</i> contaminadas com <i>F. meridionale</i> (Exp. II)						
<i>T. atroviride</i>	DC	C.A.	P.S.A.	C.R.	P.S.R.	CA/Dc	Dc/CA	DC	C.A.	P.S.A.	C.R.	P.S.R.	CA/Dc	Dc/CA
TPTecNE4	0,99 A	8,4 A	0,05 A	11,6 A	0,02 A	8,5 A	0,12 A	0,85 B	8,1 A	0,04 A	9,3 A	0,01 A	9,6 A	0,11 AB
TPPNE8	0,82 AB	7,8 A	0,05 A	10,8 A	0,02 A	9,6 A	0,11 A	0,9 AB	9,4 A	0,05 A	10,5 A	0,02 A	10,6 A	0,09 B
TPONE1	0,84 AB	8,4 A	0,05 A	11,1 A	0,02 A	10 A	0,1 A	1,06 A	8,5 A	0,05 A	11,2 A	0,03 A	8 A	0,12 A
TESTEMUNHA	0,78 B	8 A	0,05 A	11,2 A	0,02 A	10,4 A	0,1 A	0,97 AB	8,8 A	0,05 A	11,1 A	0,02 A	9,3 A	0,11 AB
Sementes de <i>P. elliottii</i> var. <i>elliottii</i> contaminadas com <i>F. fujikuroi</i> (Exp. I)								Sementes de <i>P. elliottii</i> var. <i>elliottii</i> contaminadas com <i>F. fujikuroi</i> (Exp. II)						
<i>T. atroviride</i>	DC	C.A.	P.S.A.	C.R.	P.S.R.	CA/Dc	Dc/CA	DC	C.A.	P.S.A.	C.R.	P.S.R.	CA/Dc	Dc/CA
TPTecNE4	1,02 A	9,8 AB	0,06 A	10,1 A	0,02 A	9,6 A	0,1 A	1,4 AB	12,5 A	0,08 A	10,9 A	0,03 A	9,1 AB	0,11 AB
TPPNE8	1,12 A	10,7 A	0,07 A	10,9 A	0,02 A	9,6 A	0,11 A	1,5 A	12,3 A	0,09 A	11,3 A	0,03 A	8,2 B	0,12 A
TPTecNE5	1,02 A	10,2 AB	0,06 A	9,6 A	0,02 A	9,3 A	0,11 A	1,4 AB	12,5 A	0,09 A	11,6 A	0,03 A	8,8 AB	0,11 AB
TESTEMUNHA	1,5 A	8,9 B	0,05 A	10,4 A	0,02 A	6,4 B	0,18 A	1,3 B	12,5 A	0,08 A	11,3 A	0,03 A	9,8 A	0,10 A

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Essa habilidade de promoção de crescimento de planta também já foi observada em mini estacas de *Eucalyptus* sp., cuja inoculação foi em substrato com patógeno *Cylindrocladium* spp., que promoveu o enraizamento das mesmas e aumentou a taxa de sobrevivência (FORTES *et al.*, 2007) e em plântulas de *P. radiata* (DONOSO *et al.*, 2008). Existem diversos fatores associados à promoção do crescimento de plantas por *Trichoderma* spp. como a produção de hormônios vegetais e vitaminas, a capacidade em transformar elementos no solo da forma indisponível para disponível para as plantas, absorção de minerais e, indiretamente, controlando patógenos (MELLO, 1991; SILVA *et al.*, 2006).

Mais especificamente sobre a forma de ação da espécie *Trichoderma atroviride*, atribui-se a capacidade de produção e degradação do ácido indol acético (AIA) (GRAVEL *et al.*, 2007; CARVALHO FILHO *et al.*, 2008). Essa análise não foi realizada, mas pode ser um dos mecanismos utilizados na promoção do crescimento inicial das plântulas de pinus.

Recomenda-se que mais estudos sejam conduzidos, testando-se diferentes formas de inoculação tanto do patógeno quanto do antagonista e qual a fase de desenvolvimento do hospedeiro mais eficaz para estar realizando a inoculação dos micro-organismos.

4. CONCLUSÕES

- *Trichoderma atroviride* inibiu o crescimento micelial de *Fusarium* spp. patogênico ao pinus;
- *Trichoderma atroviride* promoveu o crescimento inicial de plântulas de pinus oriundas de sementes microbiolizadas;

5. REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V.; MAFIA, R.G.; ASSIS, T.F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa: Editora UFV, 500p. 2009.
- BANKOLE, S.A.; ADEBANJO, A. Biocontrol of brown blotch of cowpea caused by *Colletotrichum truncatum* with *Trichoderma viride*. **Crop Protection**. v.15, n.7, p.633-636, 1996.
- BONFIELD, J; BEAL, K; JORDAN, M; CHEN, Y; STADEN, R. **The Staden Package Manual**, Cambridge, UK, 2006.

CARNEIRO, J. S. **Microflora associada a sementes de essências florestais.** *Fitopatologia Brasileira*, v.11, p.557-566, 1986.

CARVALHO, D.D.; GERALDINE, A.M.; LOBO JUNIOR, M.; MELLO, S.C.M. de. Biological control of White mold by *Trichoderma harzianum* in common bean under field conditions. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.50, n.12, p.1220-1224, 2015. Doi: 10.1590/S0100-204X2015001200012.

CARVALHO FILHO, M.G.; MELLO, S.C.M. de; SANTOS, R.P. dos; MENÊZES, J.E. **Avaliação de isolados de *Trichoderma* na promoção de crescimento, produção de ácido indolacético *in vitro* e colonização endofítica de mudas de eucalipto.** Brasília, DF. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e biotecnologia. 2008.

DONOSO, E.; LOBOS, G.A.; ROJAS, N. Efecto de *Trichoderma harzianum* y compost sobre el crecimiento de plântulas de *Pinus radiata* en vivero. **Bosque**. v.29, n.1, p.52-57, 2008. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-92002008000100006>.

EDGINGTON, L.V.; KNEW, K.L. & BARRON, G.L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phytopathology**. St. Paul, v.61, n.1, p.42-44, 1971.

FORTES, F.O.; SILVA, A.C.F. da; ALMANÇA, M.A.K.; TEDESCO, S.B. Promoção de enraizamento de microestacas de um clone de *Eucalyptus* sp. por *Trichoderma* spp. **Revista Arvore**. v.31, n.2, p.221-228, 2007. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-67622007000200004>.

GRAVEL, V.; ANTOUN, H.; TWEDDELL, R.J. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: possible role of indole acetic acid (IAA). **Soil Biology and Biochemistry**. v.39, p.1968-1977. 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.02.015>.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**. p.895-914, 1997. Doi: 10.1139/m97-131.

HOHMANN, P.; JONES, E.E.; HILL, R.A.; STEWART, A.. Understanding *Trichoderma* in the root system of *Pinus radiata*: associations between rhizosphere colonization and growth promotion for commercially grown seedlings. **Fungal Biology**. v. 115, n.8, p.759-767. 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2011.05.010>
IBA - Indústria brasileira de árvores. Relatório iba 2016. 2016.

JUNGES, E.; MUNIZ, M.F.; MEZZOMO, R.; BASTOS, B.; MACHADO, R.T. *Trichoderma* spp. na produção de mudas de espécies florestais. **Floresta e Ambiente**. v.23, n.2, p.237-244, 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/2179-8081.107614>.

LAZAROTTO, M.; MUNIZ, M.F.B.; BELTRAME, R.; SANTOS, A.F. dos; MÜLLER, J.; ARAÚJO, M.M. Tratamento biológico e químico em sementes de *Cedrela fissilis* para controle de *Rhizoctonia* sp. **Revista Cerne**. v.19, n.1, p.169 – 175, 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-77602013000100020>.

LAZAROTTO, M.; GIRARDI, L.B.; MEZZOMO, R.; PIVETA, G.; MUNIZ, M.F.B.; BLUME, E. Tratamentos alternativos para o controle de patógenos em sementes de cedro (*Cedrela fissilis*). **Revista Brasileira de Agroecologia**. v.4, n.2, p.75-78, 2009.

MACIEL, C.G.; WALKER, C.; MUNIZ, M.F.B.; ARAÚJO, M.M. Antagonismo de *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis* (UFV3918) a *Fusarium sambucinum* em *P. elliotii* var. *elliotii* Engelm. **Revista Árvore**. v.38, n.3, p.505-512, 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-67622014000300013>.

MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, P.; ALVES-SANTOS, F.M.; DIEZ, J.J. *In vitro* and *in vivo* interactions between *Trichoderma viride* and *Fusarium circinatum*. **Silva Fennica**. v.46, n.3, p.303-316. 2012.

MASTRETTA, C.; TAGHAVI, S.; LELIE, D. Van der.; MENGONI, A.; GALARDI, F.; GONNELLI, C.; BARAC, T.; BOULET, J.; WEYENS, N.; VANGRONSVELD, J. Endophytic bacteria from seeds of *Nicotiana Tabacum* can reduce cadmium phytotoxicity. **International Journal of Phytoremediation**. p. 251–267, 2009. <http://dx.doi.org/10.1080/15226510802432678>.

MELO, I.S. Potencialidades de utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de plantas. In: Bettiol, W. **Controle Biológico de Doenças de Plantas**. Campinas: EMBRAPA/CNPDA, 1991. p. 135-156.

MENTEN, J.O.M. **Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico**. Ed. ESALQ/FEALQ, p.312, 1991.

MORAGA-SUAZO, P.; OPAZO, A.; ZALDÚA, S.; GONZÁLEZ, G.; SANFENTES, E. Evaluation of *Trichoderma* spp. and *Clonostachys* spp. Strains to control *Fusarium circinatum* in *Pinus radiata* seedlings. **Chilean Journal of Agriculture Research**. v.71, n.3, p.412-417. 2011. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-58392011000300011>.

SANTOS, A.F. dos; PARISI, J.J.D.; MENTEN, J.O.M. Importância da sanidade das sementes florestais. In: SANTOS, A.F.; PARISI, J.J.D.; MENTEN, J.O.M. **Patologia de Sementes Florestais**. EMBRAPA Florestas, p.11-13, cap.1, 2011.

SARMENTO, M.B.; VILLELA, F.A. **Sementes de espécies florestais nativas do Sul do Brasil**. Informativo ABRATES, v.20, n.1,2, p.39-44, 2010.

SILVA, R.L. de O.; LUZ, J.S.; SILVEIRA, E.B. da; CAVALCANTE, U.M.T. Fungos endofíticos em *Annona* spp.: isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de pinha (*Annona squamosa* L.). **Acta Botanica Brasileira**. v. 20, p.649-655, 2006.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. Mega 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**. v. 24, p. 1596-1599, 2006.

WHIPPS, J.M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**. v.52, p.487-511, 2001. https://doi.org/10.1093/jexbot/52.suppl_1.487.

Capítulo 4 - CONTROLE BIOLÓGICO DE *Fusarium* spp. POR BACILOS EM SEMENTES DE PÍNUS

RESUMO: Bactérias têm demonstrado serem promissores micro-organismos no uso de controle biológico de fitopatógenos e na promoção do crescimento de diversas espécies de plantas. O objetivo desse trabalho foi testar bactérias endofíticas provenientes de sementes florestais nativas e exóticas quanto ao potencial em controlar *Fusarium* spp. em sementes de *P. taeda* e *P. elliottii* var. *elliottii*. O ensaio *in vitro* foi realizado por meio de confrontação direta entre isolados de bactéria e *Fusarium* spp. Os isolados mais promissores foram testados *in vivo* para tratamento de sementes. As sementes de *P. taeda* foram primeiramente inoculadas com *F. meridionale* e *P. elliottii* var. *elliottii* com um isolado do complexo *F. fujikuroi* e, posteriormente, as sementes foram imersas em suspensão de bactéria com concentração ajustada por espectrofotômetro em densidade ótica de 0,4 a 600 nm. Posteriormente, as sementes foram semeadas em tubetes com vermiculita. Foram utilizados cinco repetições com 20 sementes cada. Após 90 dias da semeadura, foram avaliadas emergência de plântulas e mudas sintomáticas com amarelecimento de acículas e tombamento. Após cinco meses da semeadura foram avaliados diâmetro de coleto (Dc), comprimento de parte aérea (CA) e radicular (CR), peso seco de parte aérea (PSA) e radicular (PSR), relação diâmetro de coleto e altura (Dc/CA) e de altura e diâmetro de coleto (CA/Dc). *Bacillus* sp., *B. velezensis*, *B. methylotrophicus* e *Paenibacillus polymyxa* foram eficientes no controle *in vitro* de *Fusarium* spp. *In vivo*, não houve nenhum isolado eficiente no controle nem na promoção do crescimento inicial de plântulas de pinus, quando comparados com a testemunha.

Palavras-chave: fusariose; tratamento de sementes.

Chapter 4 - BIOLOGICAL CONTROL OF *Fusarium* spp. BY BACILOS IN PINUS SEEDS

ABSTRACT: Bacteria have demonstrated to be promising microorganisms in the use of biological control of plant pathogens and in promoting the growth of several plant species. The objective of this work was to test endophytic bacteria from native and exotic forest seeds regarding the potential to control *Fusarium* spp. in *P. taeda* and *P. elliottii* var. *elliottii* seeds. The *in vitro* test was performed by means of direct confrontation between bacterial and *Fusarium* spp. isolates. The most promising isolates were tested *in vivo* for seed treatment. The *P. taeda* seeds were first inoculated with *F. meridionale* and *P. elliottii* var. *elliottii* with an isolate from the *F. fujikuroi* complex, and the seeds were later immersed in bacteria suspension at a concentration adjusted by a spectrophotometer at 0.4 of absorbance at optical density of 600 nm. Subsequently, the seeds were seeded in vermiculite tubes. Five replicates with 20 seeds each were used. Ninety days after the seeding, the emergence of seedlings and saplings with symptoms of yellowing of needles and tumbling were noticed. Five months after the seeding, the diameter of the sample (Ds), aerial part length (AL) and radicular part length (RL), aerial part dry weight (ADW) and radicular part dry weight (RDW), the ratio of the sample diameter and height (Ds/AL) and height and sample diameter (AL/Ds) were evaluated. *Bacillus* sp., *B. velezensis*, *B. methylotrophicus* and *Paenibacillus polymyxa* were efficient in the

in vitro control of *Fusarium* spp. *In vivo*, there was no isolate efficient in the control or promotion of the initial growth of pine seedlings when compared to the control.

Keywords: fusarium; treatment of seeds.

1. INTRODUÇÃO

O pínus (*Pinus* spp.), por sua fibra longa e resistente, é utilizado na fabricação de papel de qualidade superior, e a madeira sólida usada na indústria moveleira. No Brasil, a área de pínus abrange 1,6 milhões de hectares, contribuindo na geração de aproximadamente dois milhões de empregos diretos e indiretos (IBA, 2016).

Na área florestal, a perspectiva do controle alternativo de fitopatógenos aumenta cada vez mais frente à pressão da sociedade ao uso de insumos químicos nocivos ao homem e ao meio ambiente. Dentre as formas de controle alternativo, tem-se o controle biológico que é basicamente o uso de micro-organismos benéficos como fungos e bactérias, cujo objetivo principal é controlar patógenos de forma a manter um equilíbrio no ecossistema (GRIGOLETTI JÚNIOR *et al.*, 2000).

Muitos micro-organismos que atuam como agente de biocontrole de fitopatógenos podem ainda apresentar efeitos benéficos no crescimento das plantas, como prover nutrientes essenciais e ajudar as plantas a superar estresses ambientais (HALLMAN *et al.*, 1997; MASTRETTA *et al.*, 2009). Dentre os micro-organismos estudados no controle biológico, bactérias têm demonstrado sua eficiência (CUNHA *et al.*, 2006; GOUDJAL *et al.*, 2014; SHIOMI *et al.*, 2015). Dentre os poucos trabalhos realizados na área florestal, Cankar *et al.* (2005), relatam *Pseudomonas* spp. e *Rahnella* spp. com potencial de biocontrole de patógenos em sementes de picea européia (*Picea abies*). O uso de *Bacillus subtilis* foi eficiente no controle de *Cylindrocladium spathulatum* em erva-mate, por meio da produção de algumas substâncias que também inibiram a germinação de conídios do patógeno (GOMES *et al.*, 2001). *Bacillus subtilis* também controlou *Fusarium sambucinum* patogênico a *P. elliotii* var. *elliotii*, proporcionando maior vigor às plântulas (MACIEL *et al.*, 2014).

Frente ao exposto, o objetivo do presente trabalho foi testar bactérias endofíticas de sementes florestais quanto ao seu potencial de controle de *Fusarium* spp. em sementes de pínus e avaliar a capacidade em promover o crescimento inicial de plântulas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Isolamento de bactérias endofíticas

Para isolamento de bactérias endofíticas de sementes, foram utilizadas as espécies nativas: *Phytolacca dioica* L., *Balfourodendron riedelianum* (Engl.) Engl., *Aspidosperma polyneuron* Müll. Arg. e *Cordia trichotoma* (Vell.) Arrab. ex Steud; e exóticas: *Pinus greggii* Engelm., *Pinus maximinoi* H. E. Moore e *Pinus taeda* L. Foi realizado a desinfestação das sementes que consistiu de imersão em álcool 70% (v/v) por um min, quatro min em solução de hipoclorito de sódio 1% (v/v), novamente em álcool 70% (v/v) por 30 s e por último lavadas em água ultrapurificada esterilizada. Posteriormente, as sementes foram esmagadas e realizado cortes nas mesmas. Após, foi depositado 3 g de semente, em frasco Erlenmeyer contendo 100 mL de solução salina 0,85% (v/v) esterilizada, para cada espécie. Os frascos foram mantidos sob agitação por uma hora em vortex. Nos últimos 20 minutos da agitação, os frascos foram submetidos a choque térmico, sob temperatura de 80 °C +/- 2 °C, a fim de se selecionar apenas bactérias da família Bacillaceae, as quais sobrevivem a essa temperatura pela presença de endósporos. Procedeu-se a diluição seriada fator 10. As placas foram incubadas em BOD a 28 °C até o aparecimento das colônias individualizadas, as quais foram repicadas para tubos de ensaio contendo o mesmo meio, em triplicata, e preservadas em geladeira a 4 °C.

2.2 Antagonismo em culturas confrontadas

As culturas de bactéria e de *Fusarium* spp. foram confrontadas repicando-se um disco de micélio de 5 mm de diâmetro do patógeno para placas contendo meio King B, à 2 cm da borda da placa. Opostamente ao disco, foram feitas quatro estrias, duas perpendiculares às outras duas. As placas foram incubadas a 24 °C com fotoperíodo de 12 h por sete dias. A testemunha foi constituída por placas de Petri contendo meio King B, com apenas o disco de micélio do patógeno.

As placas foram avaliadas após sete dias de incubação, medindo-se os dois diâmetros perpendiculares entre si, do crescimento micelial da colônia do patógeno, e avaliado a taxa de inibição do crescimento do patógeno por meio da fórmula:

$$\% \text{ inibição} = \left(\frac{Cr_{test} - Cr_{trat}}{Cr_{test}} \right) \times 100 \quad (\text{EDINGTON } et \text{ al.}, 1971), \text{ em que } cr_{test} =$$

crescimento radial da testemunha; e cr_{trat} = crescimento radial do tratamento. O teste foi montado em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições para cada antagonista. Foi realizado a ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Scott Knott a 5 % de probabilidade.

Os isolados de bactérias endofíticas que mostraram maior taxa de inibição de crescimento micelial do patógeno foram identificados por meio da amplificação da região 16S rRNA, realizada no laboratório de cultura de tecidos da Embrapa Florestas.

Para identificação das bactérias a extração do DNA genômico foi realizada conforme metodologia de Sanbrook *et al.* (1989), pelo método clorofórmio – fenol com adaptações. Para isso, os isolados bacterianos foram crescidos em meio líquido em 1 mL de meio líquido NA (Peptona 3,2 g; Extrato de carne 3 g; H₂O destilada q.s.p. 1.000 mL; pH 7,0) durante 24 h a 28 °C sob agitação de 120 rpm. As culturas foram centrifugadas a 10.000 g durante 2 min e o sobrenadante descartado. Foram adicionados 2 mL de tampão de extração (Tris-HCl pH 8,0 125 mMol/L; NaCl 2 Mol/L; EDTA pH 8,0 50 mMol/L; SDS 1% pH 7,2) previamente aquecido em banho-maria a 60 °C. As amostras foram deixadas em vórtex horizontal a 120 rpm durante 5 min e incubadas em banho-maria 60 °C durante 20 min. Após este período, as amostras foram incubadas em gelo durante 10 min e centrifugadas a 10.000 g durante 10 min. Um mililitro do sobrenadante de cada amostra foi transferido para um novo microtubo, onde foi adicionado o mesmo volume de clorofane (1 parte de clorofórmio, CHCl₃ : 1 parte de fenol, C₆H₅OH). Os microtubos foram agitados por inversão e centrifugados durante 5 min a 10.000 g. Cerca de 90% da fase superior foram cuidadosamente transferidos para um novo microtubo e o mesmo volume de clorofil (24 partes de clorofórmio, CHCl₃ : 1 parte de álcool isoamílico, C₅H₁₁OH), foi adicionado. As amostras foram homogeneizadas por inversão e centrifugadas por 5 min a 10.000 g. Novamente, 90% da fase superior foram transferidos para um novo microtubo e o mesmo volume de isopropanol foi adicionado. As amostras foram homogeneizadas por inversão com breve agitação e centrifugadas por 20 min a 12.000 g. A fase aquosa foi vertida com cuidado e foram adicionados 500 µL de etanol 70%. Após agitar brevemente o microtubo e centrifugar durante 10 min a 12.000 g, a fase aquosa foi novamente vertida e os microtubos deixados em estufa a 37 °C durante 30 min. Após a completa secagem do microtubo, foram adicionados 50 µL de água ultra pura para ressuspender o DNA. Após 24 h, o DNA genômico

obtido foi quantificado em aparelho NanoDrop® 2000 *Thermo Scientific* e sua integridade verificada por eletroforese em gel de agarose 0,8% com marcador de peso molecular Lambda *Hind* III *Gibco*® corado com GelRed® 100x e visualizado sob luz ultravioleta para fotodocumentação.

Para a reação de PCR do gene *16S rRNA* utilizou-se os *primers* Y1 (5' TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC 3') e Y3 (5' TACCTTGTTACGACTTCACCCCAGTC 3'). Foram necessários: dNTPs a 0,2 Mm; tampão 1x; MgCl₂ a 1,5Mm; 0,2 mM de cada cada *primer*; Taq DNA polimerase a 1,25 U; 20 ng de DNA molde e água ultra pura esterilizada para um volume final de reação de 25 µL. A reação foi processada em termociclador com ciclo inicial de desnaturação a 95 °C por 2 min; 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 15 s; 93 °C por 45 s, anelamento a 55 °C por 45 s e extensão a 72 °C por 2 min; com ciclo de extensão final de 72 °C por 5 min.

Os produtos da PCR foram purificados com Acetato de amônio. A reação de sequenciamento consistiu em 1 µL de *big dye*, 0,5 µL de cada *primer*, 3 µL de tampão *save money*, 40 ng de DNA e água ultrapura para completar um volume de 10 µL. As sequências obtidas foram comparadas com as sequências do NCBI e identificadas as espécies com maior identidade.

2.3 Tratamento com bactérias endofíticas de sementes de pinus contaminadas com *Fusarium*

O experimento foi instalado apenas com as espécies *P. taeda* e *P. elliotii* var. *elliotii*. Foram selecionados os melhores isolados de bactéria que apresentaram maior porcentagem de inibição de crescimento de *F. meridionale* (FPT20) de *P. taeda* e o melhor para o isolado FPE3 pertencentes ao complexo *F. fujikuroi*, patogênico de *P. elliotii* var. *elliotii*, bem como os dois isolados comuns e que foram eficientes na inibição do crescimento micelial de todos os isolados de *Fusarium* sp. utilizados no teste *in vitro* (FPT20, FPE3, FPM2, FPC1 e FPO).

Sementes de *P. taeda* e *P. elliotii* var. *elliotii* foram desinfestadas conforme metodologia descrita no ensaio de controle *in vitro* e foram microbiolizadas em suspensão de bactéria com concentração ajustada por espectrofotômetro em densidade ótica de 0,4 a 600 nm, para cada isolado de bactéria endofítica. As sementes permaneceram imersas em suspensão bacteriana por 30 min e semeadas

em bandejas de isopor, sendo uma semente por célula. As bandejas foram mantidas em casa de vegetação até o final do ensaio.

Após 90 dias da semeadura, foi avaliada a emergência e mudas sintomáticas e, após cinco meses da semeadura, foram avaliados diâmetro de coleto (Dc), comprimento de parte aérea (CA) e radicular (CR), peso seco de parte aérea (PSA) e radicular (PSR), relação diâmetro de coleto e altura (Dc/CA) e de altura e diâmetro de coleto (CA/Dc). A testemunha foi constituída por sementes microbiolizadas apenas com o patógeno.

O ensaio foi montado em delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições de 20 sementes, para cada tratamento. Foi realizado a ANOVA e quando pertinente, foi realizado o teste Tukey a 5% de significância.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos 50 isolados de bactérias endofíticas (Tabela 4.1). Alguns isolados promoveram até 29,5% de inibição de crescimento micelial de *Fusarium* spp. (Tabela 4.1). No teste de confrontação de culturas com bactérias endofíticas houve inibição de crescimento micelial de *Fusarium* spp. chegando a 25,5% para *F. meridionale*, 23,4%, 25,6% e 29,5% para isolados do complexo *F. fujikuroi* de *P. elliotii* var. *elliotii*, *P. maximinoi* e *P. oocarpa*, respectivamente e 13,6% para *F. oxysporum* (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 - Taxa de inibição do crescimento micelial de *Fusarium fujikuroi* (isolados FPM2, FPO e FPE3), *Fusarium meridionale* (isolado FPT20) e *F. oxysporum* (isolado FPC1) por bactérias endofíticas, em meio King B, a 24 °C, com fotoperíodo de 12 h, por sete dias.

Continua

Isolado de bactéria endofítica	Inibição do crescimento micelial (%)									
	FPM2		FPO		FPT20		FPE3		FPC1	
<i>B. velezensis</i> (BPG1)	24,5	a	23,9	b	24,5	a	23,4	a	7,4	b
BPG2	15,9	c	22,3	b	23,4	a	19	a	9,2	a
BPG3	18,7	b	21,8	b	23,9	a	16,7	a	11,2	a
BPG4	22,2	a	20,7	b	22	a	16,2	a	5,1	c
<i>Bacillus</i> sp. (BPhy1)	22,9	a	29,5	a	22,4	a	16,7	a	9,4	a
BPhy2	24,2	a	20,3	c	19,7	b	9,7	a	6,5	c
BPhy3	22,7	a	17,2	c	18,9	b	12,3	a	7,4	b
BPhy4	22,4	a	17,9	c	22,2	a	15,1	a	9,6	a
BPhy5	22,2	a	23,8	b	22,2	a	15,6	a	6,5	c
BPhy6	21,9	a	15,7	c	12,6	c	11,7	a	7,2	b
BPhy7	20,6	b	18	c	11,7	c	5,8	b	5,4	c
BPhy8	23,4	a	23,4	b	25,3	a	11,2	a	9,2	a
BPhy9	21,1	b	21,1	b	23,6	a	13	a	7,8	b
<i>B. methylotrophicus</i> (BPhy10)	22,9	a	20,1	c	25,5	a	14,8	a	5,8	c
BPhy11	22,0	a	21,3	b	22	a	12,3	a	13,6	a
BPhy12	22,9	a	21,6	b	22	a	7,1	b	10,7	a
BPhy13	25,0	a	22,3	b	24,5	a	14,9	a	9,4	a
BPhy14	21,5	a	17,3	c	14,7	c	4,2	b	5,8	c
BPM1	22,4	a	18,4	c	11,5	c	5,2	b	5,6	c
BPM2	20,6	b	13,3	d	8	d	3,2	b	8,1	b
BPM3	19,6	b	15,8	c	6,5	d	3,2	b	5,4	c
BPM4	20,1	b	16,2	c	15,5	b	3,4	b	5,6	c
BPM5	20,1	b	19	c	8,8	c	1,5	b	10,1	a
BPM6	18,7	b	19,9	c	21,3	a	3,2	b	6	c
BPM7	16,5	c	11,4	d	12,1	c	12	a	4,3	d
BPM8	18,5	b	15,3	d	15,9	b	3,5	b	4,7	c
BPM9	25,6	a	19	c	12,6	c	14,1	a	7,6	b
BPT1	18,5	b	21,6	b	14,4	c	13,6	a	9,6	a
BPT2	21,1	b	19,5	c	13	c	5,5	b	7,2	b
BPT3	21,1	b	19,3	c	19,2	b	3,8	b	8,5	b
BPMf7	16,3	c	19,3	c	23,4	a	1,7	b	6	c
<i>Paenibacillus polymyxa</i> (BPMf8)	17,0	c	19,9	c	22,9	a	19,5	a	7,2	b
BPMf11	15,0	c	18,2	c	24,7	a	7,1	b	7,2	b
BPMf13	17,1	c	19,7	c	23,8	a	7,1	b	6,9	b
BPMf16	16,2	c	19,4	c	22,2	a	4,2	b	5,6	c
BPMf17	20,2	b	19,8	c	23,2	a	9,1	b	8,7	b
BA1	16,6	c	16,7	c	8,2	d	12,5	a	3,8	d
BA2	17,6	b	17,8	c	5,2	d	10,7	a	7,8	b
BA4	15,0	c	19,1	c	5,7	d	15,9	a	6,5	c

Tabela 4.1 - Taxa de inibição do crescimento micelial de *Fusarium fujikuroi* (isolados FPM2, FPO e FPE3), *Fusarium meridionale* (isolado FPT20) e *F. oxysporum* (isolado FPC1) por bactérias endofíticas, em meio King B, a 24 °C, com fotoperíodo de 12 h, por sete dias.

										Conclusão
BLP1	12,2	c	11,1	d	3,8	e	10,9	a	2,9	d
BLP2	10,2	d	8,4	d	1,1	e	4,7	b	2	d
BLP3	10,0	d	10,2	d	3,3	e	10,4	a	3,6	d
BLP4	13,1	c	13,6	d	4,8	d	9,7	a	6,9	b
BLP8	15,5	c	12,8	d	2,9	e	4,7	b	4	d
BLP9	8,5	d	7,8	d	7,3	d	3	b	6	c
BLP10	13,7	c	14,7	d	13,2	c	8,9	b	7,8	b
BLP15	18,1	b	11,7	d	9,2	c	6,4	b	5,4	c
BLP17	15,9	c	12,7	d	4,8	d	4,2	b	3,4	d
BLP18	17,1	c	13,7	d	2,7	e	11	a	2,5	d
BLP20	11,3	d	8,4	d	7,1	d	15,4	a	3,8	d
TESTEMUNHA	0,0	e	0	e	0	e	0	b	0	d

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott Knott, a 5% de significância.

Foram selecionados, a partir do teste *in vitro*, o isolado BPHY10 por ter inibido maior taxa de crescimento do isolado FPT20 de *F. meridionale*, patogênico a *P. taeda*, o isolado BPG1, por ter sido o melhor na inibição do isolado FPE3 do complexo *F. fujikuroi* e que foi patogênico a *P. elliottii* var. *elliottii* e os isolados BPMf8 e BPHY1 por terem inibido o crescimento micelial de todos os isolados de *Fusarium* spp. no teste *in vitro*. As bactérias foram identificadas como *Bacillus* sp. (BPHY1), *Bacillus velezensis* (BPG1), *Bacillus methylotrophicus* (BPHY10) e *Paenibacillus polymyxa* (BPMf8), de acordo com a região 16S.

Maciel *et al.* (2014) quando confrontaram *Bacillus subtilis* com *Fusarium sambucinum*, detectaram porcentagem de inibição de 18,7%. Neste trabalho as taxas de inibição de crescimento dos patógenos foram maiores sendo apresentado halo de inibição. Isso ocorre pelo fato de que bactérias podem produzir compostos tóxicos aos patógenos, como antibióticos, enzimas hidrolíticas e biosurfactantes e por meio de compostos voláteis (HIRASAWA *et al.*, 2006; LEELASUPHAKUL *et al.*, 2008). Os metabólitos produzidos pelas estirpes bacterianas podem difundir pelo meio de cultura inibindo o crescimento do patógeno, conforme observado. Esses resultados são consistentes com os obtidos por Soria *et al.* (2012) que avaliaram a atividade antagonista de *B. subtilis* e *Burkholderia* sp., bactérias endofíticas de plantas de pínus, contra *F. circinatum*. Eles observaram a formação de uma zona de

inibição entre o patógeno e o antagonista e que a interação mostrou mudanças no desenvolvimento e morfologia do micélio.

Quanto ao uso de bactérias endofíticas no tratamento de sementes não houve diferença quando comparados com a testemunha, ao se avaliar emergência de plântulas e mudas sintomáticas (Tabela 4.2), bem como na promoção do crescimento inicial de plântulas de *P. taeda* e *P. elliottii* var. *elliottii* (Tabela 4.3).

Tabela 4.2 - Emergência (%) de plântulas e porcentagem de plântulas doentes (%) oriundas de sementes de pinus contaminadas com *Fusarium meridionale* e *Fusarium fujikuroi* e tratadas com bactérias endofíticas.

Sementes de <i>P. taeda</i> contaminadas com <i>F. meridionale</i>		
Isolados de Bactérias	Emergência (%)	Plântulas sintomáticas (%)
BPHY10 (<i>B. methylotrophicus</i>)	20 A	0 B
BPHY1 (<i>Bacillus</i> sp.)	23 A	6,2 AB
BPMf8 (<i>P. polymyxa</i>)	15 A	30 A
Testemunha	21 A	9,5 AB
Sementes de <i>P. elliottii</i> var. <i>elliottii</i> contaminadas com um isolado do complexo <i>F. fujikuroi</i>		
Isolados de Bactérias	Emergência (%)	Plântulas sintomáticas (%)
BPG1 (<i>B. velezensis</i>)	31 B	6,7 A
BPHY1 (<i>Bacillus</i> sp.)	45 AB	2,5 A
BPMf8 (<i>P. polymyxa</i>)	55 A	0 A
Testemunha	59 A	5,2 A

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de confiança.

Tabela 4.3 - Diâmetro de coleto (Dc em mm), comprimento de parte aérea (CA em cm), Peso Seco de parte Aérea (PSA em mg), Comprimento Radicular (CR em cm), Peso Seco de Parte Radicular (PSR em mg), Relação CA/Dc, Relação Dc/CA e índice de Qualidade de Dickson (IQD) de plântulas de pinus oriundas de sementes contaminadas com *Fusarium* spp., tratadas com bactérias endofíticas

Sementes de <i>P. taeda</i> contaminadas com <i>F. meridionale</i>							
Bacilos	Dc	C.A.	P.S.A.	C.R.	P.S.R.	CA/Dc	Dc/CA
BPHY10 (<i>B. methylotrophicus</i>)	1,4 A	6,9 A	0,04 A	10,7 A	0,02 A	6,3 A	0,2 A
BPHY1 (<i>Bacillus</i> sp.)	0,96 A	7 A	0,05 A	11,2 A	0,02 A	7,4 A	0,14 A
BPMf8 (<i>P. polymyxa</i>)	0,9 A	7,4 A	0,04 A	10,9 A	0,01 A	8,2 A	0,12 A
TESTEMUNHA	0,8 A	6,5 A	0,03 A	10,6 A	0,01 A	7,8 A	0,13 A
Sementes de <i>P. elliotii</i> var. <i>elliotii</i> contaminadas com isolado do complexo <i>F. fujikuroi</i>							
Bacilos	DC	C.A.	P.S.A.	C.R.	P.S.R.	CA/Dc	Dc/CA
BPG1 (<i>B. velezensis</i>)	1,2 A	10,4 A	0,07 A	10,3 A	0,03 A	8,4 A	0,12 A
BPHY1 (<i>Bacillus</i> sp.)	1,3 A	10,6 A	0,07 A	10,6 A	0,03 A	8,4 A	0,12 A
BPMf8 (<i>P. polymyxa</i>)	1,2 A	9,9 A	0,06 A	10,1 A	0,03 A	8,2 A	0,12 A
TESTEMUNHA	1,3 A	10,9 A	0,08 A	10,8 A	0,03 A	8,5 A	0,12 A

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade de confiança.

O efeito no tratamento de sementes não foi marcante como observado em condições *in vitro*. A mesma observação foi realizada por Maciel *et al.* (2014), que após 42 dias de semeadura de *P. elliotii* var. *elliotii* inoculadas com *Fusarium sambucinum* e com os antagonistas bacterianos, não observaram efeito sobre emergência e plântulas sintomáticas. Mesmo não apresentando o efeito desejado, não deve-se descartar a possibilidade de uso desses micro-organismos. No presente trabalho, foi testado microbiolização somente nas sementes, ou seja, a ação das bactérias pode ser efetiva em outras fases da planta, principalmente quando se leva em consideração de que as bactérias foram isoladas do interior das sementes, sendo este o primeiro trabalho com bactérias endofíticas no tratamento de sementes de pinus. Segundo Silva *et al.* (2004), a forma de inoculação do agente de biocontrole é um dos fatores a serem considerados para alcançar um controle eficiente de um fitopatógeno e, Shiomi *et al.* (2006) consideram também o momento mais propício para a aplicação.

Bactérias benéficas que atuam no controle biológico de doenças em plantas e como promotores de crescimento de plantas também atuam de diferentes formas, como a produção de hormônios, competição por espaço e nutrientes, degradação da parede celular de patógenos, produção de enzimas, mineralização de nutrientes, fixação de nitrogênio e aumento de sua absorção pelas raízes, entre outros (MELO,

1998). Em espécies florestais, a ação de bactérias já foi relatada em erva-mate, controlando-se o agente causal da pinta preta (GOMES *et al.*, 2001), na cultura do eucalipto no controle de *Pseudomonas chichorii* (CUNHA *et al.*, 2006) e na sobrevivência de estacas de angico vermelho (DIAS *et al.*, 2012).

Dessa forma, outros fatores devem ser estudados como métodos de inoculação, tempo de contato entre antagonista e a semente, estágio do hospedeiro para inoculação do antagonista, concentração, determinação de compostos voláteis, substâncias liberadas por esses micro-organismos ou mesmo qual tipo de substância ou meio que pode inibir a ação dos potenciais antagonistas e que podem estar presentes nas sementes.

4. CONCLUSÕES

- *Bacillus* sp., *Bacillus velezensis*, *Bacillus methylotrophicus* e *Paenibacillus polymyxa* inibiram o crescimento micelial de *Fusarium meridionale*, isolados do complexo *Fusarium fujikuroi* e *Fusarium oxysporum*, patogênicos a pinus;
- Não houve efeito de bactérias endofíticas no tratamento de sementes de *P. taeda* e *P. elliottii* var. *elliottii*. no controle de *Fusarium* spp. e na promoção do crescimento.

5. REFERÊNCIAS

CANKAR, K.; KRAIGHER, H.; RAVNIKAR, M.; RUPNIK, M. Bacterial endophytes from seeds of Norway spruce (*Picea abies* L. Karst). **Microbiology Letters**. v.244, p.341-345, 2005. DOI: [10.1016/j.femsle.2005.02.008](https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.02.008)

CHEN, Y., MEI, R., LIU, L. & KLOEPPER, J. W. The use of yield increasing bacteria (YIB) as plant growth-promoting rhizobacteria in Chinese agriculture. In: UTKHEDE, R. S. G. V. K. **Management of Soil Born Disease**. Ludhiana: KalyaniPublishers. P. Chapter 8, p. 165-184, 1996.

CUNHA, J.F.; PICOLI, E.A.T.; ALFENAS, A.C.; GONÇALVES, R.C. Efeito *in vitro* de antibióticos e rizobactérias no controle de bactérias fitopatogênicas ao *Eucalyptus* spp. **Revista Árvore**. v.30, n.6, p.871-876. 2006. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-67622006000600001>.

DIAS, Poliana Coqueiro et al . Propagação vegetativa de progênies de meios-irmãos de angico-vermelho (*Anadenanthera macrocarpa* (Benth) Brenan) por

minietaquia. **Revista Árvore.** Viçosa, v. 36, n. 3, p.389-399, June 2012. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-67622012000300001>.

EDGINGTON, L.V.; KNEW, K.L. & BARRON, G.L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phytopathology.** St. Paul, v.61, n.1, p.42-44, 1971.

GOMES, N.S.B.; GRIGOLETTI JUNIOR, A.; AUER, C.G. Seleção de antagonistas para o controle de *Cylindrocladium spathulatum* em erva-mate. **Boletim de Pesquisa Florestal.** n.43, p.123-138, 2001.

GOUDJAL, Y.; TOUMATIA, O.; YEKKOUR, A.; SABAOU, N.; MATHIEU, F.; ZITOUNI, A. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off and promotion of tomato growth by endophytic actinomycetes isolated from native plants of Algerian Sahara. **Microbiological Research.** v.169, n.1, p.59-65, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2013.06.014>

GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; SANTOS, A.F. dos; AUER, C.G. Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais. **Revista Floresta.** v.30, n.1/2. P.155-165. 2000. <http://dx.doi.org/10.5380/rf.v30i12.2362>.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology.** p.895–914, 1997. Doi: 10.1139/m97-131.

HIRASAWA, K.; UCHIMURA, K.; KASHIWA, M.; GRANT, W.; ITO, S.; KOBAYASHI, T.; HORIKOSHI, K. Salt-activated endoglucanase of a strain of alkaliphilic *Bacillus agaradhaerens*. **Antonie van Leeuwenhoek.** v.89, n.2, p.211-219, 2006. Doi: 10.1007/s10482-005-9023-0.

IBA – **Indústria brasileira de árvores.** Relatório Iba 2016. 2016. http://iba.org/images/shared/iba_2015.pdf. Acesso em: 02 de nov. de 2016.

LEELASUPHAKUL, W.; HEMMANEE, P.; CHUENCHITT, S. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. **Postharvest Biology and Technology.** v. 48, n. 1, p. 113-121, 2008. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2007.09.024.

MACIEL, C.G.; WALKER, C.; MUNIZ, M.F.B.; ARAÚJO, M.M. Antagonismo de *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis* (UFV3918) a *Fusarium sambucinum* em *P. elliotii* var. *elliotii* Engelm. **Revista Arvore.** v.38, n. 3, p.505-512, 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-67622014000300013>.

MASTRETTA, C.; TAGHAVI, S.; LELIE, D. Van der.; MENGONI, A.; GALARDI, F.; GONNELLI, C.; BARAC, T.; BOULET, J.; WEYENS, N.; VANGRONSVELD, J. Endophytic bacteria from seeds of *Nicotiana Tabacum* can reduce cadmium phytotoxicity. **International Journal of Phytoremediation.** p. 251–267, 2009. <http://dx.doi.org/10.1080/15226510802432678>.

MELO, I.S. Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas: descrição e potencial de uso na agricultura. In: MELO, I.S. e AZEVEDO, J.L. **Ecologia Microbiana**. Jaguaruaúna. Embrapa Meio Ambiente. 1998. Pp.87-116.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SHIOMI, H.F.; MELO, I.S. de; MINHONI, M.T.A. Avaliação de bactérias endofíticas para o controle biológico da mancha foliar de *Exserohilum turcicum* em milho. **Plant Pathology**. v.82, p.01-04, 2015. DOI: 10.1590/1808-1657000642013.

SHIOMI, H.F.; SILVA, H.S.A.; MELO, I.S. de; NUNES, F.V.; BETTIOL, W. Bioprospecting endophytic bacteria for biological control of coffee leaf rust. **Scientia Agricola**. v.63, n.1, p.32-39, 2006. <https://dx.doi.org/10.1590/S0103-90162006000100006>.

SILVA, H.S.A.; ROMEIRO, R.S.; MACAGNAN, D.; HALFELD-VIEIRA, B.A.; PEREIRA, M.C.B.; MOUNTEER, A. Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: non-specific protection and increase in enzyme activities. **Biological Control**. v.29, n.2, p. 288-295, 2004. [http://dx.doi.org/10.1016/S1049-9644\(03\)00163-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1049-9644(03)00163-4).

SORIA, S.; ALONSO, R.; BETTUCCI, L. Endophytic bactéria from *Pinus taeda* L. as biocontrol agents of *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell. **Chilean Journal of Agricultural Research**. v.72, n.2, p.281-284. 2012.